

N° D'ENREGISTREMENT
AU C.N.R.S.
A.O. 4040

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Arlette GOLDMANN-MÉNAGÉ

Sujet de la Thèse. — RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES TISSUS DE
CROWN-GALL CULTIVÉS « IN VITRO ».

Soutenue le 4 février 1970 devant la Commission d'examen.

MM. GAUTHERET	<i>Président.</i>
LEDERER	} <i>Examineurs.</i>
MOREL	

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1971

N° D'ENREGISTREMENT
AU C.N.R.S.
A.O. 4040

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Arlette GOLDMANN-MÉNAGÉ

Sujet de la Thèse. — RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES TISSUS DE
CROWN-GALL CULTIVÉS « IN VITRO ».

Soutenue le 4 février 1970 devant la Commission d'examen.

MM. GAUTHERET *Président.*
LEDERER } *Examineurs.*
MOREL }

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1971



Ce travail a été réalisé à la Station centrale de Physiologie végétale de l'Institut National de la Recherche Agronomique, à Versailles. Nous remercions Monsieur BUSTARRET, Directeur général de l'I.N.R.A. et Monsieur Coïc, Chef du département de Physiologie végétale, de nous avoir permis de mener à bien ces recherches.

Notre travail a été dirigé par Monsieur MOREL, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A., à qui nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance. Il a constamment suivi et orienté nos recherches; son aide et les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer avec une inlassable bienveillance ont seuls permis l'achèvement de ce travail.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur GAUTHERET, Membre de l'Institut, de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider notre jury.

Nous voulons exprimer à Monsieur le Professeur LEDERER notre gratitude pour avoir consenti à faire partie de notre jury et pour avoir bien voulu présenter le rapport de cette thèse.

Nous n'oublions pas, enfin, tous nos collègues et amis qui, par leurs conseils et leur sympathie, nous ont aidée tout au long de ce travail.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550203_0006

RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES TISSUS DE CROWN-GALL CULTIVÉS *IN VITRO* ⁽¹⁾

Par Arlette GOLDMANN-MÉNAGÉ

SOMMAIRE

INTRODUCTION	235
HISTORIQUE	237
CHAPITRE I. — <i>Matériel et méthodes</i>	243
I. — TECHNIQUES DE CULTURES DE TISSUS <i>in vitro</i>	243
1. — <i>Obtention de tumeurs</i>	244
2. — <i>Mise en culture</i>	247
3. — <i>Culture en milieu liquide</i>	251
II. — TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE SÉPARATION DES MÉTABOLITES	251
III. — TECHNIQUES D'ANALYSE	252
1. — <i>Etude des acides aminés</i>	252
A. — Chromatographie sur papier	252
B. — Chromatographie sur colonne	253
2. — <i>Etude des guanidines</i>	254
A. — Chromatographie sur papier	254
B. — Dosage colorimétrique	255
C. — Chromatographie sur colonne	256
3. — <i>Etude des acides carboxyliques</i>	259

(1) Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences naturelles présentée à la Faculté des Sciences de Paris pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences. Thèse soutenue le 4 février 1970 devant la Commission d'Examen : MM. GAUTHERET, *Président* et LEDERER et MOREL, *Examineurs*). N° d'enregistrement au C.N.R.S. : A.O. 4040.

IV. — DÉTECTION ET MESURES DE RADIOACTIVITÉ.....	259
1. — Autoradiographie	260
2. — Mesures au compteur à scintillation.....	260
3. — Mesure de la radioactivité des solutions.....	261
V. — MISE EN ÉVIDENCE DE L'ARGINASE	261
1. — Matériel végétal	261
2. — Mesure de l'activité arginasique	261
3. — Dosage de l'urée	262
CHAPITRE II. — <i>Les guanidines des tissus de Crown-gall</i>	263
I. — MISE EN ÉVIDENCE DES GUANIDINES DES TISSUS DE CROWN-GALL.....	263
II. — L'OCTOPINE	268
1. — Extraction	269
2. — Analyse et structure	270
III. — L'ACIDE OCTOPINIQUE	272
IV. — LA NOPALINE	274
1. — Extraction	274
2. — Analyse et structure	277
A. — Hydrolyse acide	277
B. — Hydrolyse alcaline	279
C. — Oxydation permanganique	279
3. — Vérification de la structure par spectrométrie de masse	280
V. — CONCLUSION	281
CHAPITRE III. — <i>Métabolisme de l'arginine dans les tissus de Crown-gall</i>	283
I. — MODIFICATION DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE DANS LES TISSUS DE CROWN-GALL....	283
1. — Tissus de <i>Datura stramonium</i>	283
2. — Tissus de <i>Nicotiana Tabacum</i>	284
II. — BIOSYNTHESE DES GUANIDINES	285
1. — Rôle de l'arginine dans la biosynthèse des guanidines.....	285
A. — Résultats	286
a) Tissus de <i>Nicotiana Tabacum</i>	286
b) Tissus de <i>Datura stramonium</i>	288
c) Tissus de <i>Scorzonera hispanica</i>	288
B. — Conclusion	289
a) Tissus sains	290
b) Tissus de Crown-gall	290
2. — Rôle du pyruvate dans la biosynthèse des guanidines	291
A. — Etude de l'incorporation d'acide pyruvique $2\text{-}^{14}\text{C}$ dans les cultures de tissus de Crown-gall de scorsonère	292
a) Analyse des acides aminés	292
b) Analyse des acides organiques	294
B. — Etude de l'incorporation d'acide pyruvique $2\text{-}^{14}\text{C}$ dans les cultures de tissus sains de scorsonère	295
a) Analyse des acides aminés	295
b) Analyse des acides organiques	296

C. — Comparaison du métabolisme de l'acide pyruvique dans les deux types de tissus	296
D. — Participation du pyruvate à la biosynthèse de la nopaline	297
CONCLUSION	299
BIBLIOGRAPHIE	304

- L'abréviation « J.F.M. » indique que les photos ont été prises par J. F. MULLER.
 — L'abréviation « J.T. » indique que les inoculations ont été faites par J. TEMPÉ.

RÉSUMÉ

La transformation tumorale entraîne, dans les tissus de Crown-gall, des déviations du métabolisme azoté qui se traduisent par l'apparition de deux guanidines : l'octopine et la nopaline. La présence de l'une ou de l'autre de ces substances est indépendante de la plante-hôte, mais dépend de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* qui a provoqué la tumeur.

L'origine de l'information pour les enzymes nécessaires à la synthèse de ces guanidines est discutée.

SUMMARY

Crown-gall tissues synthesize two specific guanidines, octopine and nopaline, which are products of arginine metabolism.

The occurrence of either guanidine does not depend on the plant host but on the *Agrobacterium tumefaciens* strain which has induced the tumor.

The origin of the information for the enzymes involved in the synthesis of these guanidines is discussed.

INTRODUCTION

La transformation tumorale, c'est-à-dire le processus par lequel une cellule devient cancéreuse et acquiert ainsi la propriété de se développer d'une façon anarchique en échappant au contrôle de l'individu, est un des phénomènes les plus intrigants de toute la biologie.

Les cellules végétales, comme les cellules animales, sont susceptibles de subir une telle transformation. Chez les végétaux, les tumeurs les plus étudiées et les mieux connues sont les tumeurs appelées « Crown-gall », ainsi nommées parce que, dans la nature, on les rencontre surtout au

collet de certaines plantes. L'agent responsable de cette transformation est une bactérie : *Agrobacterium tumefaciens* (SMITH et TOWNSEND) Conn, qui fut isolée par SMITH et TOWNSEND en 1907. Dès cette époque, la découverte de SMITH eut un profond retentissement en raison de l'analogie que présente le Crown-gall avec les cancers des animaux et aussi parce que, pour la première fois, il était possible de provoquer, à volonté, des formations tumorales par simple inoculation d'une bactérie. SMITH, jusqu'à la fin de sa carrière, s'attacha à démontrer l'identité du phénomène chez les plantes et les animaux (SMITH, 1912, 1916, 1925 *a*, *b*, 1926). Mais il fallut attendre les travaux de BRAUN et WHITE pour avoir la preuve que les tissus de Crown-gall constituent un véritable cancer.

Leurs recherches ont en effet établi d'une manière certaine que les tissus de Crown-gall sont capables de se développer *in vitro* sur un milieu qui n'assure pas la croissance des tissus sains dont ils sont issus, qu'ils ont acquis la capacité de proliférer d'une manière autonome lorsqu'on les greffe sur une plante saine, en échappant au contrôle de l'organisme. Ils répondent donc exactement à la définition des cancers. Ainsi, une fois la transformation accomplie, la multiplication anarchique de la cellule devient un processus autonome complètement indépendant de la bactérie inductrice.

A la suite de ces résultats, BRAUN (1947) émit alors l'hypothèse de l'élaboration, par la bactérie, d'un « principe inducteur de tumeur », responsable de la transformation tumorale. Les acides nucléiques étant le support de toute information génétique, il était tentant de supposer que l'ADN de la bactérie, en transmettant une information aux cellules végétales, était responsable de leur transformation. Bien qu'il ne soit pas encore démontré que le « principe inducteur de tumeur » soit en fait l'ADN de la bactérie, beaucoup d'auteurs considèrent ce fait comme acquis. S'il en est bien ainsi, on conçoit que l'introduction d'une information nouvelle dans le génome d'une cellule normale entraîne des modifications profondes de son fonctionnement. On doit alors pouvoir trouver, dans la cellule transformée, certaines activités enzymatiques modifiées par rapport à celles existant dans la cellule saine. C'est cet aspect du problème qui a fait l'objet de cette étude.

Notre attention a été attirée par certaines déviations importantes du métabolisme azoté. Nous avons pu, en effet, mettre en évidence dans les tissus de Crown-gall plusieurs substances qui n'existent pas dans les tissus sains correspondants; ces composés particuliers sont des guanidines monosubstituées. Nous avons alors entrepris l'extraction et l'identification de ces métabolites nouveaux et nous nous sommes intéressés à l'étude de leur biosynthèse dans le but de rechercher les relations possibles entre l'action transitoire de la bactérie et ces modifications métaboliques permanentes.

HISTORIQUE

Notre travail a pour but l'étude de métabolites anormaux qui apparaissent dans les tissus de Crown-gall au cours de la transformation tumorale et que l'on ne rencontre jamais en dehors de ces tissus.

Nous examinerons rapidement, dans cet historique, les modifications biochimiques qui ont été signalées dans les tumeurs animales, puis dans les tissus de Crown-gall. La déviation du métabolisme de l'arginine, que nous avons constatée dans les tissus de Crown-gall, nous a amenée à nous intéresser tout particulièrement à cet amino-acide; c'est pourquoi nous étudierons les différentes voies métaboliques que peut suivre l'arginine chez les végétaux.

Les études biochimiques de la cellule cancéreuse débutèrent, il y a environ quarante ans, avec les travaux de WARBURG. WARBURG (1926, 1966), avait montré en effet que des tranches de tissus cancéreux sont capables de dégrader le glucose en acide lactique aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène; il émit alors l'hypothèse que le pouvoir élevé de glycolyse, que possèdent en général les cellules tumorales, est un caractère fondamental de l'état cancéreux. Mais on sait maintenant que d'autres types de tissus, comme par exemple certains tissus embryonnaires, peuvent également présenter cette propriété. L'hypothèse de WARBURG, si elle n'a pas la portée universelle que voulut lui donner son auteur, suscita cependant et continue de susciter un nombre considérable de travaux consacrés aux processus d'oxydation (PITOT, 1966); mais bien que certaines différences quantitatives aient été mises en évidence, il ne semble pas y avoir dans les tissus cancéreux une nouvelle orientation systématique des mécanismes respiratoires.

Les cellules cancéreuses se caractérisent essentiellement par certaines modifications des affinités cellulaires; la perte de l'« inhibition de contact », qui normalement contrôle les aptitudes d'une cellule à se diviser, se traduit par la capacité qu'ont les cellules tumorales d'envahir les tissus sains et de donner parfois des métastases. Ce phénomène permet de distinguer facilement, *in vitro*, les cellules normales des cellules cancéreuses : les cellules normales se divisent jusqu'à ce qu'elles forment une couche monocellulaire; les cellules cancéreuses, au contraire, forment des masses irrégulières épaisses de plusieurs couches de cellules. On conçoit que cette propriété ait suscité de nombreux travaux biochimiques. Toutefois, jusqu'à présent, les seuls résultats dignes d'être mentionnés ont trait à la présence de quantités importantes d'acide sialique dans la membrane de

certaines cellules tumorales (FORRESTER et al., 1962). L'acide sialique, qui dérive des mucopolysaccharides et des mucoprotéines de la membrane, serait en partie responsable des mobilités anormales que présentent ces cellules lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique.

Un certain nombre de peptides et de protéines anormales — taxohormones, mucoprotéines, globulines — ont été observés dans divers tissus cancéreux et constituent les seules différences biochimiques qui sont actuellement connues. Mais, comme dans le cas de la glycolyse, la présence de ces substances n'est pas vraiment caractéristique des tissus cancéreux; en effet, on peut les retrouver à l'occasion de diverses maladies et même sous l'action de substances toxiques (BUSCH, 1963).

Par contre, dans le cas des tumeurs animales d'origine virale, on a pu mettre en évidence une information génétique nouvelle apportée par le virus bien que celui-ci, une fois incorporé au génome de la cellule, ne soit plus directement observable. Les virus oncogènes à ADN comme le « *Simian virus* », ou SV 40, et le virus du polyome ont un poids moléculaire d'environ 3.10^6 . Si on admet que le tiers ou le quart de l'information contenue dans le virus est utilisé à la synthèse de la capside, il reste suffisamment d'ADN pour coder entre quatre et huit protéines nouvelles. En comparant les cellules normales aux cellules transformées, on a pu constater la présence, dans ces dernières, de six protéines nouvelles codées par le virus (DUL-BECCO, 1969). La première est un antigène de surface, nommé antigène de transplantation; cet antigène serait responsable de la perte de l'« inhibition de contact » et du phénomène de rejet dans le cas des greffes. La seconde concerne l'antigène T (tumor antigen); des études d'immunofluorescence ont montré qu'il est présent dans le noyau des cellules transformées. La troisième est une enzyme qui intervient dans la replication de l'ADN viral; elle est appelée fonction Ts-a du nom d'un mutant thermosensible capable de transformer la cellule à 31° C, mais pas à 39° C. La quatrième concerne la synthèse d'un facteur activant la replication de l'ADN cellulaire. La cinquième est une thymidine-kinase qui a des propriétés différentes de celles des cellules saines. La dernière, qui n'a été observée qu'avec le virus SV 40, rend la cellule transformée sensible à un adénovirus qui ne l'infecte pas normalement. CASSINGENA et TOURNIER (1968) ont, d'autre part, mis en évidence dans les cellules transformées par le SV 40 un « répresseur » qui bloquerait la replication de l'ADN viral.

On peut penser que certaines de ces protéines virales sont responsables de l'état tumoral.

Dans le cas des tumeurs cutanées provoquées chez le lapin par le virus du « Papillome de Shope », la présence d'une forte activité arginasique est également considérée comme un marqueur biochimique associé à l'infection et qui traduit la présence silencieuse du génome viral (PASSEN et SCHULTZ, 1965). D'autres exemples de modifications enzymatiques ont été décrits: ainsi, dans les cellules *HeLa* infectées par l'adénovirus T₅, une forte augmentation de l'aspartate-transcarbamylase a été constatée (CON-

SIGLI et GINSBERG, 1964). Chez la souris, le « LDH-Virus » provoque, en même temps que l'apparition de tumeurs, une augmentation considérable du taux de la lactico-déshydrogénase du plasma (NOTKINS et SCHEELE, 1967).

La découverte de la sensibilité de certaines cellules leucémiques à la L. asparaginase reste, jusqu'à présent, dans la recherche des différences entre tissus sains et tissus cancéreux, un des résultats les plus spectaculaires. Ces cellules, en effet, sont dépourvues d'une enzyme, l'asparagine-synthétase, qui, dans la cellule normale, permet la transformation d'acide aspartique en asparagine; les cellules cancéreuses ont alors besoin, pour survivre d'un apport externe d'asparagine. Si on supprime cet acide aminé indispensable en le détruisant par l'asparaginase, la cellule leucémique meurt (PRAGER et BACHYNSKY, 1968).

Il est généralement admis que l'état cancéreux serait un retour à un état non différencié; ce fait a pour conséquence une plus grande indépendance de la cellule cancéreuse à l'égard des conditions extérieures. Ce caractère se retrouve d'ailleurs dans le Crown-gall. Il est intéressant de noter que les cellules leucémiques qui présentent un métabolisme anormal de l'asparagine n'ont pas atteint une plus grande autonomie; au contraire, elles ne sont plus capables d'assurer une fonction de la cellule normale.

Chez les végétaux, les études biochimiques des cellules cancéreuses ont été beaucoup moins nombreuses. Toutefois, à la suite des travaux réalisés par WARBURG et son école dans le domaine animal, un grand nombre de chercheurs s'attachèrent, dans le cas du Crown-gall, à l'étude des phénomènes d'oxydation, mais aucune différence qualitative n'a pu être observée entre tissus sains et tissus tumoraux. Ainsi, l'activité des enzymes associées aux réactions d'oxydation (catalase, peroxydase, polyphénoloxydase) est sensiblement la même dans les deux types de tissus; l'activité de la cytochrome-oxydase est réduite dans les tissus de Crown-gall et LANCE (1967) estime qu'un remaniement des oxydases terminales accompagne l'acquisition du caractère tumoral. Des études de SCOTT et al. (1964) sur les enzymes qui participent à la glycolyse et au cycle de KREBS n'ont pas fait apparaître de propriétés particulières aux tissus tumoraux.

Comme dans les tissus animaux, on a pu constater que certaines propriétés de la membrane cellulaire sont modifiées au cours de la cancérisation. WOOD et BRAUN (1965) ont en effet établi qu'une augmentation graduelle et progressive de la perméabilité cellulaire accompagne le processus de la transformation tumorale; ils ont montré que les cellules tumorales ont acquis une plus grande efficacité dans l'utilisation de certains ions minéraux; ces ions permettraient alors l'activation de systèmes enzymatiques qui sont en relation avec la croissance et la division cellulaire.

L'acquisition de caractères biochimiques liés à la croissance a d'ailleurs été établie depuis longtemps. Les tissus de Crown-gall sont capables, en effet, d'élaborer des auxines en quantité supérieure à celle des tissus sains et suffisamment pour assurer leur croissance (KULESCHA et GAUTHERET, 1948; HENDERSON et BONNER, 1952); ceci se traduit, *in vitro*, par la propriété

que possèdent les tissus tumoraux de proliférer en l'absence de substances de croissance. Ils sont également capables de synthétiser une nouvelle substance de division dérivée de la nicotinamide (WOOD et al., 1969); les cellules saines pourraient synthétiser ce composé mais seulement sous l'action de la kinéline ou d'autres purines substituées. BRAUN estime alors que la transformation tumorale entraînerait l'activation permanente des systèmes enzymatiques responsables de la synthèse de ce facteur de division (BRAUN, 1969).

Les cellules tumorales élaborent, en plus des substances nécessaires à leur croissance et à leur division, d'autres métabolites que les cellules saines sont incapables de synthétiser ou ne synthétisent qu'en très faible quantité; ces nouveaux métabolites sont le signe de modifications du métabolisme azoté des cellules saines. Ainsi, LIORET (1958) isole des tissus de Crown-gall un nouvel acide aminé, la lysopine; sa structure fut déterminée par BIEMANN et al. (1960) : il s'agit de la α -N-2-propionyl-lysine, produit de condensation de la lysine et de l'acide pyruvique. Ce composé aurait été retrouvé par SEITZ et HOCHSTER (1964) dans des tissus sains de tabac et de tomate, mais en quantité beaucoup plus faible que dans les tissus tumoraux. Nous avons nous-même constaté la présence, dans les tissus de Crown-gall, de guanidines monosubstituées qui n'ont jamais été mises en évidence, jusqu'à présent, dans des tissus sains. Ces guanidines dérivent directement de l'arginine et nous allons examiner maintenant le métabolisme de cet amino-acide.

La diversité des réactions auxquelles l'arginine peut prendre part chez les êtres vivants est remarquable. Ainsi, elle peut être soumise à plusieurs sortes de réactions qui constituent chaque fois des points d'attaque différents de la molécule : des réactions de désamination oxydative aboutissent à l'acide α -céto- δ -guanidovalérique; des réactions de décarboxylation conduisent à l'agmatine; des réactions de déguanidylation donnent soit l'ornithine, soit la citrulline, selon les enzymes mises en jeu. Enfin, des réactions de transguanidylation permettent le transfert du groupe amidine sur la glycine, la canaline, l'acide γ -aminobutyrique ou l'hydroxylamine (MEISTER, 1965).

Toutes ces réactions ont été parfaitement étudiées chez les animaux et un grand nombre de micro-organismes; chez les végétaux, par contre, le métabolisme de l'arginine a été moins approfondi.

Cependant, l'acide α -céto- δ -guanidovalérique a été trouvé dans les graines de *Phlox decussata* (BRANDNER et VIRTANEN, 1964) et dans les pousses de *Picea glauca* (DURZAN et RICHARDSON, 1966). L'acide γ -guanido-butyrique, plus largement répandu, a été signalé chez *Ricinus communis* (MOURGUE et al., 1953), dans différents fruits (IRREVERRE et al., 1957) et chez divers champignons; on le trouve également dans certains tissus de Crown-gall (MÉNAGÉ et MOREL, 1962). Les travaux de BARNES (1962), en particulier, ont montré que sa biosynthèse à partir de l'arginine passe par l'intermédiaire de l'acide α -céto- δ -guanidovalérique comme chez les inver-

tébrés marins (ROCHE et al., 1952), ce qui est la preuve de l'existence de L-amino-acide-oxydases.

Dans certaines plantes, comme le ricin (MOURGUE et al., 1953) et l'avoine (SMITH, 1963), la présence d'agmatine indique que l'arginine est soumise à des réactions de décarboxylation.

On connaît mieux les mécanismes de déguanidylation qui, chez les plantes comme chez la plupart des animaux, constituent la voie principale du métabolisme de l'arginine; ils mettent en jeu une arginase. Cette enzyme a été mise en évidence chez *Vicia sativa*, *Trifolium pratense*, *Lupinus luteus* (KIESEL, 1909), *Canavalia ensiformis* (STOCK et al., 1938), dans les graines des gymnospermes (GUITTON, 1957), chez *Helianthus tuberosus* (DURANTON, 1959), *Limonium vulgare* (LARHER et GOAS, 1967), *Arum italicum* (BRUNEL et BRUNEL-CAPELLE, 1965), *Vicia faba* (BRUNEL-CAPELLE et BAILLY-FENECH, 1967), *Datura stramonium* (JINDRA et STABA, 1968) et chez de nombreuses espèces de Ptéridophytes (BALDY et GUITTON, 1962).

Une réaction de transguanidylation a été découverte dans le carpophore de *Panus tigrinus* par MIERSCH et REINBOTHE (1967); le groupe amidine de l'arginine se fixe sur l'acide γ -aminobutyrique; ce mode de biosynthèse de l'acide γ -guanidobutyrique avait déjà été décrit chez certains tissus animaux (PISANO et al., 1957). Ceci constitue une voie nouvelle de dégradation de l'arginine en ornithine, différente de la voie classique de dégradation par l'arginase; elle n'a pas été décrite, jusqu'ici, chez les plantes supérieures. L'arginine peut participer, d'autre part, à la biosynthèse de certaines guanidines par transfert de son groupe amidine sur une chaîne carbonée de nature variable; ainsi, la canavanine et la galégine se formeraient par transfert du groupe amidine de l'arginine sur la canaline d'une part (MOTHES, 1961), et sur l'isopentenyl-amine d'autre part (REUTER, 1963).

Une autre voie de dégradation de l'arginine peut également conduire, tout comme chez certains micro-organismes, à la formation de N-carbamylputrescine et de putrescine. Ainsi, MARETZKI et al. (1969) ont constaté que les cellules de canne à sucre cultivées sur un milieu enrichi en arginine ^{14}C dégradaient cet amino-acide en N-carbamylputrescine; la biosynthèse de cette amine se ferait par l'intermédiaire soit de l'agmatine, soit de la citrulline. Chez le tabac, la dégradation de l'arginine en putrescine pourrait être une des voies de synthèse du noyau pyrrolidine de la nicotine (YOSHIDA et MITAKE, 1966). Ce catabolisme particulier de l'arginine se produit également dans certains cas pathologiques; SMITH (1963) a pu ainsi montrer que des plantules d'orge se développant sur des milieux carencés en potassium accumulaient de grandes quantités d'agmatine et de putrescine.

En 1932, KREBS et HENSELEIT ont émis l'hypothèse d'une synthèse cyclique de l'arginine par l'intermédiaire de l'ornithine et de la citrulline, qui a été vérifiée chez les animaux et les micro-organismes. Chez les végétaux, on s'accorde à penser qu'il en est de même bien que toutes les étapes du cycle n'aient pu être mises en évidence; un certain nombre d'enzymes

ont cependant été décrites : des carbamate-kinase, ornithine-transcarbamylase, arginosuccinate-synthétase. La dégradation de l'arginine, selon le cycle de KREBS-HENSELEIT, conduit non seulement à l'ornithine mais aussi à l'acide glutamique et à la proline, comme l'ont montré les travaux de DURANTON (1958) chez *Helianthus tuberosus* et les travaux de BARNES et NAYLOR (1961) chez les conifères. KASTING et DELWICHE (1958) chez *Citrullus vulgaris* et GUITTON (1957) chez *Pinus pinea* ont retrouvé les mêmes réactions. Les relations ornithine-acide glutamique, vraisemblablement par l'intermédiaire de la γ -semi-aldéhyde glutamique, sont extrêmement importantes, car elles établissent un lien entre l'arginine et les acides carboxyliques du cycle de KREBS. Les relations ornithine-proline, spécialement étudiées par DURANTON (1959) mettent en jeu également la γ -semi-aldéhyde glutamique capable de se cycliser spontanément en acide 1-pyrroline-5-carboxylique.

Dans les tissus de Crown-gall, nous avons pu mettre en évidence un type de métabolisme de l'arginine différent de tous ceux que nous venons d'examiner. On sait que chez certains invertébrés marins, l'arginine peut se condenser avec l'acide pyruvique en présence d'une déshydrogénase spécifique pour former de l'octopine (THOAI et ROBIN, 1959). C'est ce type de métabolisme jamais encore signalé chez les végétaux et qui semble être spécifique des tissus de Crown-gall qui fait l'objet de ce travail.

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — TECHNIQUES DE CULTURES DE TISSUS *IN VITRO*

La technique des cultures de tissus mise au point par GAUTHERET, en 1939, s'est révélée un outil remarquable pour les études du métabolisme cellulaire; en effet, les tissus cultivés *in vitro* sont constitués de masses de cellules affranchies de la complexité des phénomènes de corrélation qui existent dans la plante entière; ils ont l'avantage de se développer sur des solutions synthétiques parfaitement définies et en milieu aseptique, ce qui permet de leur faire absorber un métabolite bien déterminé et de suivre son devenir par les techniques habituelles de l'analyse sans craindre qu'il ne soit altéré par les micro-organismes.

La culture des tissus animaux a été depuis longtemps appliquée à l'étude de nombreux problèmes de pathologie; plus particulièrement en oncologie, elle a conduit à d'importants résultats depuis que l'on sait induire expérimentalement des cancers à l'aide de certains virus. En biologie végétale, rappelons que c'est la technique des cultures de tissus qui a permis à WHITE et à BRAUN de démontrer la nature cancéreuse du Crown-gall; c'est également cette méthode que BRAUN a utilisée pour montrer que la cellule tumorale peut, dans certaines conditions, régresser et redonner une plante normale. La technique des cultures de tissus a permis, en outre, de supprimer les interactions et les compétitions entre tumeurs et tissus de l'hôte; il devient alors possible de comparer valablement les propriétés physiologiques et biochimiques des tissus de Crown-gall et des tissus sains qui leur correspondent. C'est précisément cette propriété que nous utilisons.

Au cours de nos recherches, nous avons en effet été amenée à étudier, pour les comparer, un certain nombre de souches de tissus de Crown-gall, de tissus sains et de tissus de différentes tumeurs végétales. Nous avons pour cela utilisé les souches anciennes entretenues au laboratoire, ainsi que certaines souches de tissus de Crown-gall spécialement isolées pour ce travail. L'origine et les caractéristiques de ces tissus sont rapportées dans les tableaux I, II et III. Nous décrivons simplement ici les techniques utilisées pour l'obtention de tumeurs et pour leur mise en culture.

1. — OBTENTION DE TUMEURS

Pour infecter les tissus sains, nous avons utilisé les souches suivantes d'*Agrobacterium tumefaciens* (SMITH et TOWNSEND) Conn :

SOUCHE	AUTEUR	HÔTE
B ₆ (1)	KENT (1935).	<i>Lycopersicum esculentum</i> .
A ₆ (2)	RIKER (1924).	<i>Rubus occidentalis</i> .
T ₃₇ (3)	RIKER (1926).	<i>Juglans regia</i> .
IIBV ₇ (1)	BRAUN (1946).	<i>Chrysanthemum frutescens</i> .
(1) STONIER, 1960. (2) WRIGHT et al., 1930. (3) RIKER et al., 1930.		

Les bactéries sont entretenues sur le milieu de KORNBERG (LEHMANN et KORNBERG, 1958) :

KH ₂ PO ₄	0.85 %
K ₂ H PO ₄	1,1 %
Glucose	1,0 %
Extrait de levure	0.6 %
Gélose	1,0 %

Elles sont conservées à la température de 2 à 3° C et repiquées environ tous les mois. Avant l'inoculation, on les repique une ou deux fois à 29° C puis on les cultive sur le milieu de KORNBERG liquide, dans des fioles de FOURNEAU de 125 ml placées sur un agitateur à bactéries; elles sont inoculées après 24 heures de culture, alors qu'elles sont dans la phase de croissance exponentielle; la suspension bactérienne contient environ 10¹⁰ bactéries par millilitre.

L'inoculation est réalisée en scarifiant des tiges jeunes avec un vaccinostyle et en déposant sur la plaie une goutte de la suspension de bactéries ou bien en plaçant une goutte sur la surface de section de la tige fraîchement décapitée. On peut également faire l'inoculation *in vitro* sur des fragments de racine de carotte ou de scorsonère ou des rhizomes de

topinambour découpés en cubes et cultivés sur la solution minérale de KNOP additionnée de 3 % de glucose : on dépose avec précaution une goutte de la suspension bactérienne à la surface du fragment, en prenant garde à ce qu'elle ne coule pas sur le milieu gélosé.

TABLEAU I. — CULTURES DE TISSUS SAINS

ESPÈCE ET ORGANE	AUTEUR ET DATE	MILIEU	SUBSTANCES STIMULANTES
<i>Daucus carota</i> L., racine.	GAUTHERET, 1939.	Heller, glucose 2 %.	AIA 10^{-8} , vitamine B ₁ 10^{-6} .
<i>Helianthus tuberosus</i> L., rhizome.	GAUTHERET, 1941.	Knop, glucose 3 %.	ANA 10^{-6} , puis 5.10^{-7} .
<i>Scorzonera hispanica</i> L., racine.	GAUTHERET, 1941.	Heller, glucose 3 %.	AIA 5.10^{-8} .
<i>Cratægus monogyna</i> Jacq., tige.	MOREL, 1948.	Knop, glucose 3 %.	ANA 3.10^{-7} , lait de Coco 5 %.
<i>Nicotiana Tabacum</i> L. White Burley, tige.	MOREL, 1948.	Skoog, glucose 3 %.	ANA 10^{-7} , kinétine 10^{-7} , inositol 10^{-4} .
<i>Rubus reflexus</i> Ker., tige.	MOREL, 1948.	Knop, glucose 3 %.	ANA 5.10^{-8} .
<i>Vitis Davidii</i> (Ramon) Foex, tige.	MOREL, 1948.	Knop, glucose 5 %.	Lait de Coco 10 %.
<i>Datura stramonium</i> L., tige.	CHAN et STABA, 1963.	Murashige et Skoog, glucose 3 %.	2-4-D 10^{-6} , inositol 0,5 %, mélange vitaminique Chan et Staba (1965).
<i>Opuntia vulgaris</i> M., fruit.	TOURNEUR, 1967.	Skoog, glucose 3 %.	ANA 10^{-6} .
<i>Vinca rosea</i> L., tige.	PETIT, 1967.	Heller, saccharose 2 %.	ANA 5.10^{-7} , lait de Coco 15 %.

En général, quinze jours après l'inoculation, on commence à voir apparaître des néoplasmes; le développement des tumeurs demande de un à trois mois. Suivant le matériel végétal et la souche de bactéries utilisés, la morphologie est extrêmement variée; la surface de la tumeur peut être lisse ou subérifiée, incolore ou chlorophyllienne (photos 1 et 2). Certaines plantes, comme le datura, le tabac ou le kalanchoë, inoculées avec les

TABLEAU II. — CULTURES DE TISSUS DE CROWN-GALL

ESPÈCE ET ORGANE	SOUCHE DE BACTÉRIE	AUTEUR ET DATE	MILIEU	SUBSTANCES STIMULANTES
<i>Nicotiana Tabacum</i> L., White Burley, tige.	A ₆ .	MOREL, 1946.	Skoog, glucose 3 %.	
<i>Opuntia vulgaris</i> M., raquettes.	« Anthémis »	MOREL, 1946.	Knop, glucose 5 %.	
<i>Vitis vinifera</i> L., tige.	A ₆ .	MOREL, 1946.	Skoog, glucose 3 %.	
<i>Helianthus tuberosus</i> L., rhizome.	A ₆ .	GAUTHERET, 1947.	Heller, glucose 5 %.	
<i>Scorzonera hispanica</i> L., racine.	A ₆ .	GAUTHERET, 1948.	Heller, glucose 5 %.	
<i>Nicotiana Tabacum</i> L., tige.	T ₃₇ .	BRAUN, 1948.	Skoog, glucose 3 %.	Vit. B (1).
<i>Parthenocissus tricuspidata</i> (Sieb. et Zucc.) Planck, tige.	A ₆ .	MOREL, 1949.	Knop, glucose 3 %.	
<i>Daucus carota</i> L., racine.	B ₆ .	MOREL, 1967.	Heller, glucose 3 %.	Vit. B (1).
<i>Datura stramonium</i> L., tige.	B ₆ .	MOREL, 1967.	Skoog, glucose 3 %.	Vit. B (1).
<i>Epiphyllopsis gærthneriana</i> , tige.	B ₆ .	MOREL, 1967.	Skoog, glucose 3 %.	Vit. B (1).
<i>Vinca rosea</i> L., tige.	B ₆ .	MOREL, 1967.	Heller, glucose 5 %.	
<i>Canavalia ensiformis</i> D. C., tige.	B ₆ .	MOREL, 1968.	Skoog, glucose 3 %.	Vit. B (1).
<i>Canavalia ensiformis</i> D. C., tige.	T ₃₇ .	MOREL, 1968.	Skoog, glucose 3 %.	Vit. B (1).

(1) Mélange vitaminique de Morel : pantothénate de calcium : 1 mg/l; inositol : 100 mg/l; biotine : 0,01 mg/l; acide nicotinique : 1 mg/l; pyridoxine : 1 mg/l; thiamine : 1 mg/l.

souches T₃₇ ou H BV₇, produisent des tumeurs extrêmement complexes, capables de former des ébauches de tissus organisés; ces tumeurs sont appelées tératomes (photos 3, 4 et 5). Signalons que, pour certaines espèces, nous n'avons pas réussi à contrôler tous les facteurs qui contribuent à la formation de la tumeur. Chez certaines Cactées (*Opuntia*, *Pereiskia*) ou *Chenopodiaceae*, l'apparition des tumeurs est extrêmement capricieuse et aberrante; il faut souvent une centaine d'inoculations par plante pour obtenir une seule tumeur qui se développe d'ailleurs normalement.

TABLEAU III.— CULTURES DE TISSUS DE TUMEURS VÉGÉTALES
AUTRES QUE CROWN-GALL

ESPÈCE ET ORGANE	TYPE DE TUMEUR	AUTEUR ET DATE	MILIEU	SUBSTANCES STIMULANTES
<i>Rumex acetosa</i> L., racine.	Virologique (Wound Tumor Virus).	NICKELL, 1952.	Nickell, saccharose 2 %.	Vitamine B ₁ 10 ⁻⁶ .
<i>Nicotiana glauca</i> Graham × <i>Nicotiana langsdorffii</i> Schrank, tige.	Génétique.	WHITE, 1939.	Skoog, glucose 5 %.	
<i>Scorzonera hispanica</i> L., racine.	Anergic.	GAUTHERET, 1948.	Heller, glucose 5 %.	
<i>Parthenocissus tricuspidata</i> (Sieb. et Zucc.) Planck, tige.	Anergic.	MOREL, 1948.	Knop, glucose 3 %.	Lait de Coco 5 %.

2. — MISE EN CULTURE

Les opérations de mise en culture sont identiques à celles qui ont été établies pour les tissus sains, mais elles sont compliquées par le fait que la tumeur primaire renferme toujours des bactéries. La quantité de bactéries contenues à l'intérieur des tissus varie d'ailleurs d'une manière considérable suivant les espèces : certaines, comme *Nicotiana Tabacum* ou *Scorzonera hispanica*, en renferment relativement peu, si bien que lorsqu'on met en culture des fragments de 50 à 100 mg prélevés à l'intérieur de la tumeur âgée de deux mois, on a un pourcentage de contaminations qui n'excède pas 75 %; d'autres au contraire, comme *Daucus carota* ou *Lycopersicum esculentum*, sont extrêmement contaminées et en opérant dans les mêmes condi-



PHOTO 1. — Tumeur provoquée par la souche B₆
sur *Lycopersicum esculentum*. (J.F.M.).



PHOTO 2. — Tumeurs provoquées par *Agrobacterium rubi*
sur *Datura stramonium*.



PHOTO 3. — Tumeur provoquée par la souche T₅₇ sur *Kalanchoë daigremontiana*. (J.T.)

tions on obtient rarement des cultures aseptiques. Nous avons alors essayé de nombreux antibiotiques, notamment la Vancomycine qui, selon BOYLE et PRICE (1963), est très active contre la bactérie du Crown-gall, mais le pourcentage des contaminations est resté le même en ajoutant cette substance au milieu de culture. Il faut alors prélever le plus tard possible les tumeurs apparues sur la plante. Quand on fait ce prélèvement après quatre à cinq mois, le nombre des contaminations semble diminuer; on prélève alors des explantats très petits, de 10 à 20 mg, en prenant soin de flamber les instruments chaque fois qu'ils ont touché un fragment de tissu. En opérant dans ces conditions, on diminue considérablement la proportion de cultures contaminées. Un certain nombre de cultures échappent à l'infection et permettent d'établir une souche de tissu tumoral.

On sait que les besoins nutritifs des tissus tumoraux sont plus faibles que ceux des tissus normaux : beaucoup prospèrent sur une simple solution minérale glucosée, sans aucun facteur de croissance. En général, la plupart des explantats stériles se développent très rapidement, mais dans certains cas — *Vicia sativa*, *Ricinus communis* —, on observe, après une période de croissance rapide, un ralentissement considérable et la majorité des cultures meurent; on atténue de façon spectaculaire ce phénomène en ajoutant au milieu des substances complexes comme le lait de Coco ou l'extrait de Pois



PHOTO 4. — Tératome de *Datura tatula*. (J.T.-J.F.M.).



PHOTO 5. — Tératome de *Nicotiana Tabacum* var. Wis.
provoqué par la souche IIBV₇. (J.T.-J.F.M.).

préparé de la manière suivante : les pois sont broyés dans l'eau puis stérilisés 20 minutes à 110° C; le broyat est centrifugé et le surnageant ajouté au milieu de culture (FUKAMI et MAC-KINNEY, 1967). La croissance reprend alors. Après quelques passages sur ce milieu complexe, on peut repiquer les cultures sur des milieux simples, tels que KNOP ou HELLER glucosés; leur croissance ne subit aucun ralentissement et continue normalement. Nous ignorons complètement la raison de cette crise passagère. Notons, cependant, que l'on retrouve cette crise dans les cultures de cellules humaines transformées par le SV 40 : 20 à 30 semaines après l'infection, ces cellules traversent une crise pendant laquelle la plupart d'entre elles meurent. Après cette période de crise, un petit nombre de cellules prolifère et permet d'établir des souches de cellules tumorales (SHEIN et al., 1964; GIRARDI et al., 1965).

D'une manière générale et chaque fois que cela a été possible, les tissus tumoraux et les tissus sains qui leur correspondent ont été cultivés sur le même milieu minéral.

3. — CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

Pour les études de métabolisme, nous avons été amenée à cultiver des tissus en milieu liquide. Les colonies, coupées en petits fragments ou en tranches pour augmenter la surface de contact avec le milieu, sont placées aseptiquement dans des fioles de FOURNEAU de 125 ml, contenant 10 ml de milieu auquel est ajouté, d'une manière stérile, le ou les métabolite(s) que l'on désire étudier, par exemple un acide aminé radioactif. De l'air stérile barbote continuellement dans le milieu pour assurer une bonne respiration des tissus; le CO₂ rejeté est piégé dans un absorbeur rempli de billes de verre qui baignent dans une solution concentrée de soude. Les cultures sont maintenues à température constante à 23° C.

II. — TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE SÉPARATION DES MÉTABOLITES

Pour étudier le métabolisme azoté des tissus de Crown-gall, nous avons dû extraire les différents métabolites des tissus et les séparer les uns des autres.

a) Les tissus séparés du milieu liquide par filtration sur Büchner et rincés à l'eau bi-permutée sont congelés dans l'azote liquide; ils sont ensuite

broyés à froid au broyeur à bille Dangoumeau. La poudre ainsi obtenue est mise en suspension dans un minimum d'eau à 3° C puis à nouveau broyée au Potter.

b) Le broyat est centrifugé 20 mn à 15 000 g. Le culot est alors hydrolysé à l'acide chlorhydrique 6 N, par chauffage à reflux, pendant 18 heures, en vue de l'analyse des acides aminés des protéines. Au surnageant, on ajoute 4 volumes d'alcool à 96° C. Les protéines solubilisées précipitent. Elles sont recueillies par centrifugation puis hydrolysées comme les protéines du culot de centrifugation.

c) Le surnageant, déprotéiné, est mis en contact avec une résine cationique AG50 WX8 (30-50 mesh, Biorad) sous forme H^+ , qui fixe les cations. La résine est séparée par décantation et lavée à l'eau; les acides aminés sont élués sélectivement de cette résine par une solution d'ammoniaque M.

d) Le surnageant et les eaux de lavage de la résine cationique sont alors mis en contact avec une résine échangeuse d'anions, la Dowex 2 x 8 (30-50 mesh) sous forme carbonate, qui fixe les acides organiques. La résine est séparée par décantation et lavée. Les acides organiques sont élués de cette résine par une solution de carbonate d'ammonium M/2.

e) L'ensemble de la fraction non retenue sur les résines constitue la fraction neutre et renferme surtout des sucres.

On sépare donc, par ce processus :

- les acides aminés;
- les acides carboxyliques;
- les produits non ionisés;
- les débris cellulaires et les protéines, dont on peut libérer les acides aminés par hydrolyse.

D'autre part, le CO_2 dégagé par les tissus au cours d'une expérience mettant en jeu une molécule marquée au ^{14}C peut être recueilli dans des absorbeurs contenant une solution concentrée de soude.

III. — TECHNIQUES D'ANALYSE

1. — ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

A. — *Chromatographie sur papier.*

Pour l'étude qualitative des acides aminés, nous avons fait appel à la chromatographie bidimensionnelle sur papier, suivant la technique de LEVY et CHUNG (1953).

Le papier utilisé est un papier Whatman n° 40.

Pour la première dimension, nous employons comme solvant le mélange butanol - acide acétique - eau, dans les proportions 4-1-5.

Après séchage et vaporisation sur les chromatogrammes d'un tampon borate à pH 9,3, nous employons, pour la seconde dimension, le mélange phénol - m. crésol - tampon borate, dans les proportions 2-4-1.

La technique de révélation à la ninhydrine a été mise au point par MENORET (1960); le réactif utilisé est le suivant :

Ethanol	100 ml
Ninhydrine	2 g
2-4-6-collidine	0,5 ml
2-6-lutidine	1,5 ml

Après vaporisation de cette solution sur les chromatogrammes, ceux-ci sont placés encore humides dans la cuve à révélation. La cuve est préalablement saturée en vapeurs d'alcool; elle est mise dans un four à 70° C pendant 25 minutes. Les chromatogrammes sont ensuite séchés à l'air libre puis déposés dans une étuve obscure à 25° C pendant trois heures, pour éviter le développement d'une teinte de fond gênante. La quantité optimale de chaque acide aminé, pour obtenir une bonne révélation par cette technique, est de 0,1 μ M.

B. — Chromatographie sur colonne.

L'utilisation de l'analyseur automatique Technicon nous a permis une étude à la fois qualitative et quantitative de la fraction acides aminés. Cet appareil fait appel à la méthode de séparation par chromatographie sur colonne de résine mise au point pour la première fois par MOORE et STEIN (1951). Cet appareil automatique nous a été très précieux; il permet la séparation de tous les acides aminés sur une seule colonne. Les améliorations principales comportent l'utilisation de particules de résines sphériques qui permettent d'accélérer les séparations et de diminuer le diamètre des colonnes et donc la charge en acides aminés; la charge optimale est de 0,5 μ M d'acide aminé; la limite inférieure est de l'ordre de 0,01 μ M. La sensibilité de la méthode colorimétrique est telle qu'il suffit d'une fraction de l'éluat pour la révélation à la ninhydrine; le reste peut alors être soumis à d'autres déterminations, comme la mesure de la radioactivité. La grande souplesse de l'appareil analytique nous a permis de l'adapter à d'autres analyses telles que le dosage des guanidines.

2. — ÉTUDE DES GUANIDINES

A. — *Chromatographie sur papier.*

Pour la mise en évidence des guanidines monosubstituées, nous avons utilisé la chromatographie descendante à une seule dimension, sur papier Whatman n° 1 lavé à l'eau et traité par pulvérisation d'une solution de soude 0,2 N; ce traitement améliore en effet la séparation des guanidines. Les solvants que nous avons utilisés couramment sont les suivants :

Butanol - acide acétique - eau	73 - 10 - 17
Pyridine - alcool isoamylique - acide acétique - eau	80 - 40 - 10 - 40
Propanol - acide acétique - eau	40 - 10 - 40

Le développement des chromatogrammes se fait dans une chambre dont la température est maintenue constante à 23° C.

Pour identifier certaines guanidines en les localisant d'une façon précise par rapport aux acides aminés, nous avons utilisé la chromatographie sur papier à deux dimensions, en employant le système de solvants de LEVY et CHUNG déjà décrit.

Après séchage jusqu'à élimination du solvant, les chromatogrammes sont révélés à l'aide du réactif de SAKAGUCHI (1925); en milieu alcalin, les guanidines monosubstituées donnent une coloration rose avec l' α -naphтол et l'hypobromite; cette réaction est très spécifique puisque seules réagissent les guanidines monosubstituées à l'exception de la nitroguanidine, des di- et triméthylguanidines symétriques. Plusieurs techniques ont été décrites; nous utilisons la suivante : deux solutions sont successivement vaporisées sur les chromatogrammes :

Solution I :

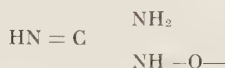
10 mg α -naphтол dans 100 ml éthanol 95° contenant 5 g d'urée.
Au moment de l'emploi, on ajoute 5 g de potasse.

Solution II :

0,7 ml de brome dans une solution de potasse à 5 %.

Après la pulvérisation de la solution I, le chromatogramme est séché dans un courant d'air froid. Les guanidines apparaissent instantanément en rose sur fond blanc. La sensibilité est de 2 à 5 μg ; pour les chromatogrammes à deux dimensions, la sensibilité est beaucoup plus faible car le phénol du second solvant, difficile à éliminer totalement, gêne la réaction de SAKAGUCHI.

Nous avons également employé le réactif de FEARON et BELL au pentacyanoammonioferrate trisodique (P.C.A.F.), qui est spécifique de la fonction guanidoxy (FEARON et BELL, 1955) :



Il permet de distinguer les dérivés comme la canavanine et la déamino-canavanine des autres guanidines. Le P.C.A.F. est préparé à partir de nitroprussiate de Na, selon FEARON (1946); le réactif est un mélange à volumes égaux de solution de P.C.A.F. à 1 % et de tampon phosphate de potassium 0,2 M à pH 7,0. La canavanine donne immédiatement une coloration rouge Magenta tout à fait caractéristique; la sensibilité est d'environ 5 μg .

Le réactif de JAFFÉ, à l'acide picrique, permet de caractériser les composés à fonction $=\text{CO}$; il permet de révéler les guanidines cyclisées, comme la créatinine et la glyocyamidine et les guanidines à fonction cétonique, comme l'acide α -céto- δ -guanidovalérique, mais ce réactif est très peu spécifique car il réagit avec tous les dérivés cétoniques.

Sa composition est la suivante : 20 ml NaOH 10 % + 80 ml d'une solution saturée d'acide picrique. La créatinine, les guanidines cétoniques apparaissent en orange sur fond jaune.

B. — Dosage colorimétrique.

Pour le dosage colorimétrique des guanidines, nous avons préféré, à la réaction classique de SAKAGUCHI, la réaction de ROSENBERG au diacétyle- α -naphthol (ROSENBERG et al., 1956) : on sait, depuis VOGES et PROSKAUER (1898), que certaines guanidines donnent une coloration rouge avec le diacétyle en milieu alcalin; BARRIT (1936) puis ROSENBERG ont stabilisé et amélioré la coloration en introduisant de l' α -naphthol dans le réactif.

La réaction de SAKAGUCHI est très spécifique mais le dosage est délicat, la coloration est instable et elle est gênée, en particulier, par de trop fortes concentrations en sels. Or, nous avons souvent à analyser les éluats de colonnes chromatographiques et les sels des tampons empêchent la réaction. La réaction au diacétyle- α -naphthol est moins spécifique (les dérivés disubstitués réagissent aussi), mais elle est plus facile à réaliser et moins

sensible aux inhibiteurs. Elle n'est pas gênée par de fortes concentrations salines; ROSENBERG l'a rendue plus sensible vis-à-vis des guanidines mono-substituées en augmentant la concentration en α -naphtol et en utilisant le propanol comme solvant. C'est dans les conditions décrites par cet auteur que nous effectuons les dosages.

Réactif de ROSENBERG :

20 ml d'une solution d' α -naphtol à 25 % dans le propanol primaire + 2,5 ml d'une solution de diacétylène à 0,1 % dans l'eau. Ce mélange est amené à 100 ml avec du propanol primaire.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en arginine entre 0,05 et 0,6 μ M. On ajoute, à 1 ml de la solution à doser, 1 ml de soude 3 N puis 2 ml du réactif de ROSENBERG. Après mélange, le volume est amené à 10 ml avec de l'eau. Les mesures sont faites au photocolorimètre *MECI* à 535 nm, 30 minutes après l'addition du réactif.

C. — *Chromatographie sur colonne.*

Nous avons mis au point, à l'aide de notre analyseur d'acides aminés Technicon, un système d'analyse automatique des guanidines (MÉNAGÉ et al., 1966). La séparation chromatographique de ces composés se déroule exactement dans les mêmes conditions (tampons, autogrades, débit de la pompe, température) que la séparation classique des acides aminés. A la sortie de la colonne de résine, l'éluat est divisé en deux fractions; l'une est analysée à la ninhydrine pour la révélation des acides aminés, l'autre sert à la révélation des composés guanidiques.

Nous avons utilisé la coloration que donnent les guanidines avec le diacétylène et l' α -naphtol en milieu alcalin mais, pour des raisons pratiques, nous avons dû modifier le réactif de ROSENBERG; il a fallu, en effet, l'adapter aux exigences de notre appareil analytique. La réaction est faite dans des canalisations en verre. Les réactifs sont pompés au moyen d'une pompe péristaltique ou pompe proportionnante qui comporte des tuyaux en chlorure de polyvinyle; afin que l'élasticité de ces tubes ne soit pas altérée, le propanol utilisé dans la réaction de ROSENBERG a été remplacé par du méthylglycol à 50 %. Nous avons également diminué la concentration en α -naphtol afin qu'il ne précipite pas dans les canalisations. Dans ces conditions, la coloration se développe en 30 minutes et reste stable pendant 20 minutes; le maximum de coloration est à 535 nm. Les phénols et les

acides aminés, à très forte concentration, ont un effet inhibiteur, mais cet effet reste négligeable dans les conditions où nous opérons.

Trois solutions sont préparées :

Solution I :

α -naphtol à 8 % dans le mélange méthylglycol - eau 1/1.

Solution II :

Diacétyle à 0,1 % dans le mélange méthylglycol - eau 5/1.

Solution III :

Soude 6 N.

L'éluat prélevé au bas de la colonne est mélangé à la soude; le mélange est segmenté par des bulles d'air avant l'addition des réactifs I et II. Le mélange réactionnel est envoyé dans une bobine de mélange puis dans un serpentín de verre où il séjourne pendant environ 25 minutes avant que la coloration obtenue soit analysée dans un colorimètre à 535 nm (fig. 1).

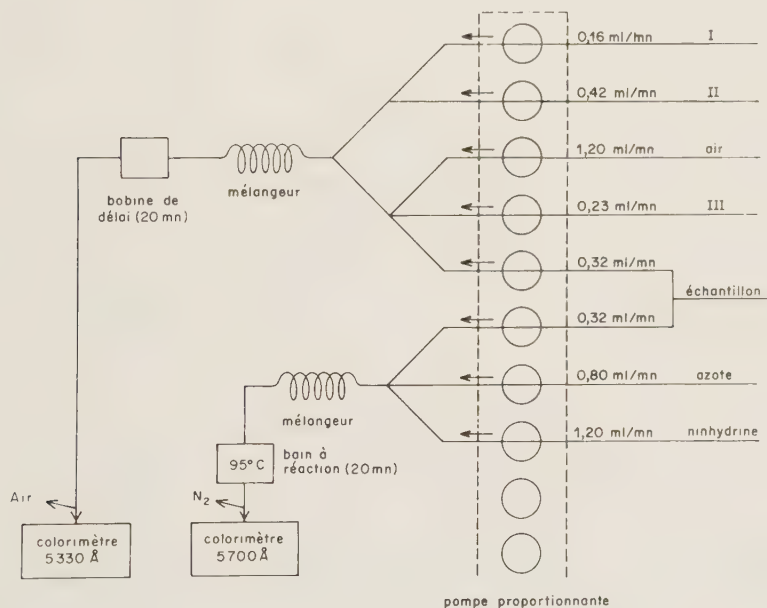


FIG. 1. — Schéma de montage du circuit analytique.

Ce dispositif permet donc de connaître, en une seule analyse, les acides aminés et les guanidines contenus dans un matériel végétal. Nous avons pu déterminer ainsi la position et l'ordre de sortie de plus d'une vingtaine de guanidines monosubstituées. La figure 2 présente une séparation obtenue

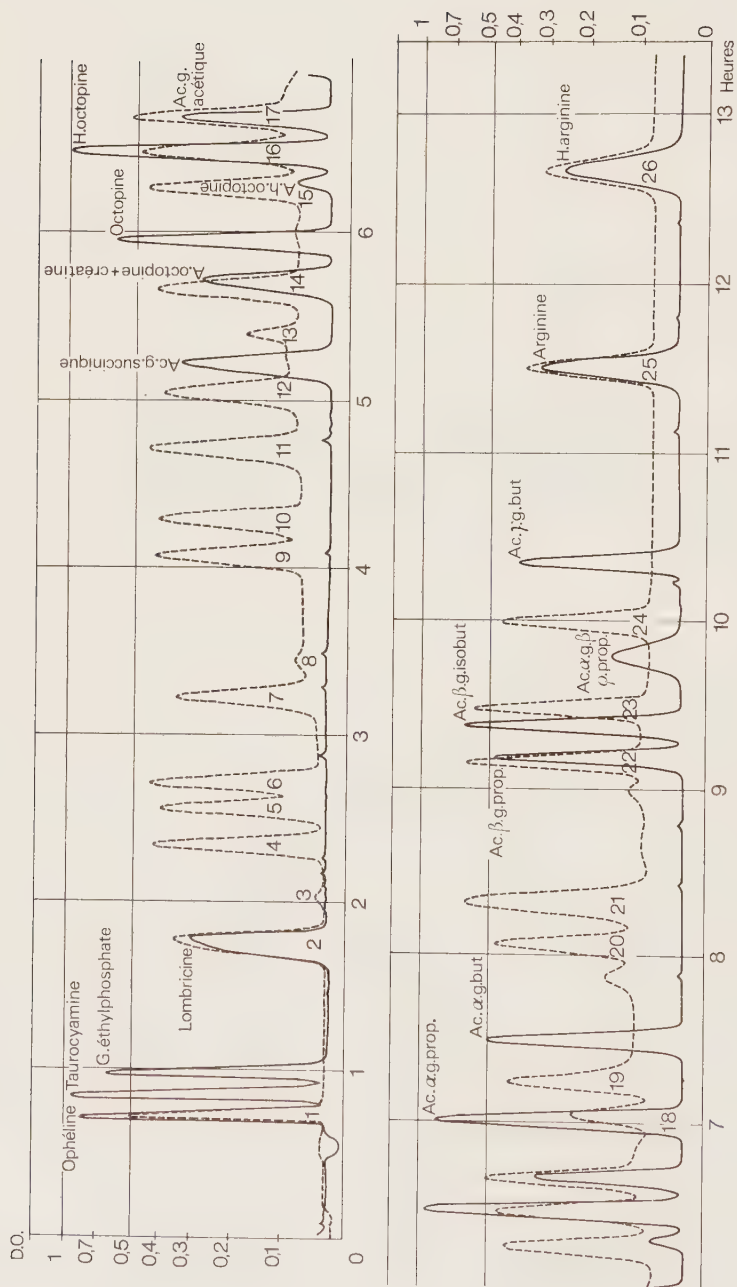


FIG. 2. — Chromatogramme de guanidines monosubstituées.

Enregistrement en trait plein : guanidines, dans leur ordre de sortie, avec, entre parenthèses, la charge en micromoles : ophéline^a (0,5), taurocymamine^a (0,5), guanido-éthyl-phosphate^a (0,5), lombricine^a (0,5), acide guanidosuccinique (WALKER et MYERS, 1953) (0,6), créatine + allooctopine (IZUMIYA et al., 1957) (0,2 + 0,3), octopine (IZUMIYA et al., 1957) (0,5) allohomoctopine (0,05), homoctopine (0,95) (TEMPÉ et MOREL, 1966), glycocymamine (BRAND et BRAND, 1955) (0,3), acide α-guanido propionique^b (1,0), acide α-guanido butyrique^b (0,4), acide β-guanido propionique^b (0,4), acide β-guanido isobutyrique^b (0,5), acide α-guanido β-phényl propionique^b (0,2), acide γ-guanido butyrique^b (0,4), arginine (0,4), homoarginine^b (0,4).

En pointillé : substances réagissant à la ninhydrine 0,4 μM, sauf précision contraire, avec les conventions habituelles : 1, taurine; 2, lombricine (0,5); 3, hydroxyproline; 4, acide aspartique; 5, thréonine; 6, sérine; 7, acide glutamique; 8, proline; 9, glycine; 10, alanine; 11, acide α-amino-butérique; 12, valine; 13, cysteine; 14, méthionine; 15, isoleucine; 16, leucine; 17, norleucine; 18, tyrosine; 19, phénylalanine; 20, acide γ-amino butyrique; 21, ammoniac; 22, ornithine; 23, lysine; 24, histidine; 25, arginine; 26, homoarginine.

^a Nous remercions très vivement M^{me} Y. ROBIN pour ces produits. Voir à ce sujet ROBIN (1964). ^b Préparés selon WALKERS et MYERS (1953) à partir de bromhydrate d'éthylisothiourée. ^c Préparés selon BRAND et BRAND (1955).

avec un mélange-étalon de 42 produits, dont 26 réagissent avec la ninhydrine et 19 avec le réactif au diacétyle. On remarque, en analysant un tel chromatogramme, que la courbe d'éluion d'un amino-acide n'est pas modifiée par la présence d'une guanidine éluée simultanément; les guanidines correspondant à des acides aminés connus sortent après ceux-ci et l'ordre de sortie n'est pas modifié.

3. — ÉTUDE DES ACIDES CARBOXYLIQUES

L'étude qualitative des acides carboxyliques a été réalisée par chromatographie sur papier à deux dimensions, selon CHEFTEL et al. (1952). Le papier employé est le Whatman n° 40. La composition des solvants est la suivante :

1 ^{er} solvant, alcalin.	éthanol	80
	ammoniaque	5
	eau	15
2 ^e solvant, acide.	n. propanol	70
	benzoate de méthyle	30
	acide formique	20

La révélation est faite avec une solution de bleu de bromophénol à 0,1 % dans l'éthanol. Pour une bonne révélation, il faut environ 5 μ -équivalent de chaque acide.

IV. — DÉTECTION ET MESURES DE RADIOACTIVITÉ

Une des méthodes les plus classiques qui permet de connaître les réactions auxquelles participe un métabolite bien déterminé consiste à marquer cette molécule et à rechercher, ensuite, en suivant la répartition de la radioactivité, à quels composés elle a pu donner naissance. Pour étudier le métabolisme de l'arginine et les voies de biosynthèse des guanidines, nous avons utilisé de l'arginine et du pyruvate de sodium marqués au ^{14}C . Plusieurs techniques ont été utilisées pour détecter les métabolites marqués au ^{14}C , spécialement les acides aminés et les acides organiques, et pour mesurer leur radioactivité.

1. — AUTORADIOGRAPHIE

La méthode la plus simple est l'autoradiographie. Il suffit de séparer, par chromatographie sur papier, les constituants à étudier et d'appliquer sur les chromatogrammes un film qui révélera ainsi l'emplacement des taches radioactives, identifiables ensuite par révélation à la ninhydrine ou au bleu de bromophénol. Nous utilisons des films Regulix de Kodak; les temps de contact sont en général de 15 et de 30 jours. L'intensité des taches radioactives, repérées sur le chromatogramme, a été mesurée en plaçant sur le papier la fenêtre d'un tube compteur FHZ 15 a, relié à une échelle de comptage FRIESEKE et HOEPFNER.

2. — MESURES AU COMPTEUR A SCINTILLATION

Nous avons également séparé les acides aminés par chromatographie sur colonne de résine; une partie de l'éluat, à la sortie de la colonne, est analysée automatiquement sur l'appareil Technicon; l'autre partie est recueillie sur un collecteur de fractions et la radioactivité de chacune des fractions est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation automatique Tricarb de PACKARD. Le mélange scintillant est le suivant :

PPO (1)	5 g/l
POPOP (2)	50 mg/l
Naphtalène	80 g/l
Toluène	385 ml
Dioxane	385 ml
Ethanol	230 ml

(1) PPO : 2-5-diphényloxazole.
 (2) POPOP : 1-4-bis-(5-phényloxazol-2-yl) benzène.

Aux pics d'acides aminés tracés automatiquement sur le chromatogramme de l'analyseur Technicon, on peut ainsi faire correspondre des pics de radioactivité.

Plus récemment, le compteur à scintillation a été couplé à l'analyseur automatique : l'éluat, au sortir de la colonne, passe directement dans une cellule à anthracène du compteur à scintillation PACKARD puis est analysé à la ninhydrine. Les pics d'acides aminés et les pics de radioactivité sont ainsi enregistrés simultanément.

3. — MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ DES SOLUTIONS

La radioactivité totale des différentes fractions organiques (acides aminés, acides organiques, sucres...) est mesurée directement sur l'extrait; une partie aliquote des solutions est déposée avec une micropipette au centre d'une coupelle d'aluminium et amenée à sec au moyen d'un ventilateur. Les mesures de radioactivité sont effectuées à l'aide d'un compteur à courant gazeux Tracerlab, qui comporte une fenêtre en nylon aluminisé placée sous un château de plomb.

V. — MISE EN ÉVIDENCE DE L'ARGINASE

Nous avons utilisé la méthode mise au point par JINDRA et STABA (1968), qui consiste à mesurer colorimétriquement l'urée apparue dans un milieu en présence d'arginine comme substrat. L'urée est dosée à l' α -isonitroso-propionophénone en milieu acide, selon la technique de FULLER et GIBSON (1952).

1. — MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les tissus sont prélevés, selon les cas, après 3 ou 4 semaines, soigneusement débarrassés de la gélose du milieu et pesés. Ils sont alors broyés au mortier avec du sable de Fontainebleau et le broyat est filtré à travers un morceau de gaze. L'extrait obtenu est utilisé pour les mesures d'activité arginasique.

2. — MESURE DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE

La réaction est effectuée dans de simples tubes à essai. Le mélange contient : 1 ml d'extrait enzymatique et 1 ml d'une solution d'arginine 0,1 M à pH 9,5. Les tubes sont ensuite incubés à 40° C pendant des périodes de 6, 15, 24 et 30 heures. Afin d'éviter les contaminations bactériennes, une goutte de toluène est déposée à la surface de la solution contenue dans chaque tube. Après incubation, on arrête la réaction par addition de 2 ml d'une solution à 24 % d'acide métaphosphorique. Chaque échantillon est alors centrifugé à la centrifugeuse JOUAN (4 000 t/mn) et le surnageant est utilisé pour le dosage de l'urée.

Les témoins sont préparés en ajoutant l'acide métaphosphorique à l'extrait enzymatique avant l'addition du substrat. Ils sont ensuite traités selon le protocole décrit.

3. — DOSAGE DE L'URÉE

L'urée est dosée, selon FULLER et GIBSON, par une méthode colorimétrique qui repose sur la coloration qu'elle donne avec l' α -isonitrosopropiophénone en milieu acide.

Une fraction aliquote du surnageant est amenée dans un tube à essai à 10 ml avec une solution d'acide sulfurique et d'acide phosphorique (90 ml $\text{SO}_4\text{H}_2 + 270$ ml PO_4H_3 dilué à 600 ml avec H_2O). On ajoute alors 0,5 ml d'une solution à 3 % d' α -isonitrosopropiophénone. Les tubes à essai obturés par une bille de verre et protégés de la lumière sont ensuite placés pendant une heure au bain-marie bouillant.

Après ce temps, les tubes doivent rester protégés de la lumière jusqu'au moment de la lecture de la densité optique au spectrophotomètre Beckman D.U.; les mesures se font à 540 nm.

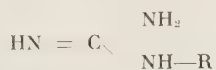
Une courbe témoin d'urée est obtenue en ajoutant des quantités connues d'urée aux extraits non incubés. On vérifie, pour chaque type de tissu, que l'extrait enzymatique seul, la solution d'arginine sans extrait enzymatique, ne contiennent pas d'urée au temps 0 et aux différents temps d'incubation.

CHAPITRE II

LES GUANIDINES DES TISSUS DE CROWN-GALL

Nous avons pensé, au début de ce travail, que l'étude des déviations du métabolisme des tissus de Crown-gall pourrait peut-être donner quelques indications sur la nature de la transformation subie par ces tissus. Nous avons fait alors toute une série d'analyses comparées de tissus sains et de tissus tumoraux de mêmes espèces cultivés dans des conditions identiques, dans le but de rechercher des différences de composition chimique.

En examinant la fraction azotée soluble de tissus de Crown-gall, nous avons remarqué qu'elle renferme, d'une manière constante, un certain nombre de guanidines monosubstituées. Ces composés sont caractérisés par la présence d'un même groupe fonctionnel, le radical guanidyl, qui dérive de la guanidine, un atome d'hydrogène de celle-ci étant substitué par une chaîne carbonée R de nature quelconque :



On connaît également des guanidines di- et trisubstituées par remplacement de deux ou trois atomes d'hydrogène.

I. — MISE EN ÉVIDENCE DES GUANIDINES DES TISSUS DE CROWN-GALL

Il est très facile de mettre en évidence les guanidines des tissus de Crown-gall : il suffit de séparer par chromatographie sur papier les acides aminés libres dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4-1-5) et de révéler les chromatogrammes à l'aide du réactif de SAKAGUCHI.

Nous avons examiné toutes les souches tumorales à notre disposition

au laboratoire — souches anciennes, certaines cultivées depuis plus de vingt ans (tableau I) — ainsi que les souches normales correspondantes (tableau II); ce sont les tumeurs d'*Helianthus tuberosus*, *Scorzonera hispanica*, *Nicotiana Tabacum*, *Vitis vinifera*, *Parthenocissus tricuspidata*, *Daucus carota*, *Vinca rosea* et *Opuntia vulgaris*. Nous avons également étudié de nouvelles souches tumorales obtenues plus récemment avec la bactérie B₆ : ce sont les tumeurs de *Datura stramonium*, *Vicia sativa*, *Tavarsia grandiflora*, *Canavalia ensiformis*, *Epiphyllopsis gaerthneriana* et *Lycopersicum esculentum*. Dans tous les cas, on voit apparaître sur les chromatogrammes une ou plusieurs taches. La plupart des souches étudiées contiennent de l'arginine, accompagnée souvent d'acide γ -guanidobutyrique, et un composé inconnu en quantité très importante, qui n'existe pas dans les tissus sains correspondants. Les chromatogrammes d'acides aminés des tumeurs d'*Opuntia vulgaris* sont différents; ils présentent des guanidines de R_f différents de celles des autres tumeurs étudiées (GOLDMANN et MOREL, 1967). Nous avons recherché ces guanidines dans un certain nombre de tumeurs primaires obtenues par inoculation de la souche B₆ d'*Agrobacterium tumefaciens* : tumeurs primaires d'*Helianthus tuberosus*, *Datura stramonium*, *Kalanchoë daigremontiana* et *Daucus carota*; nous y avons retrouvé des guanidines; selon les espèces, on peut les mettre en évidence 3 ou 4 semaines après l'inoculation de la bactérie.

Nous pensions, au début, que les différences observées entre les tumeurs d'*Opuntia vulgaris* et les autres tumeurs pouvaient provenir des différences métaboliques qui existent entre les deux types de tissus. Les Cactées, en effet, ont non seulement un métabolisme respiratoire spécial, du type crassulacéen, mais elles élaborent aussi toute une série de pigments azotés apparentés aux bétacyanines que l'on ne rencontre que chez les Centrospermales (PIATTELLI et MINALE, 1964).

Ayant eu l'occasion d'analyser les tissus de la souche de tératome de tabac isolée par BRAUN après inoculation de la souche T₃₇ d'*Agrobacterium tumefaciens* (BRAUN, 1951), nous y avons retrouvé les mêmes guanidines que celles des tumeurs d'*Opuntia*; cependant, les tumeurs de tabac obtenues à l'aide de la souche B₆ ne se différenciaient pas des tumeurs de vigne, carotte, datura, etc. Nous avons alors pensé que la souche bactérienne utilisée pour l'inoculation devait avoir une influence sur la nature des guanidines trouvées dans les tumeurs; nous avons recherché l'origine de toutes les anciennes souches de tissus de Crown-gall : toutes avaient été obtenues à l'aide des souches B₆ ou A₆; seule la souche de Crown-gall d'*Opuntia vulgaris* provenait de tissus inoculés avec la souche « Anthémis » de l'Institut Pasteur, souche que E. SMITH avait isolée d'une tumeur de *Chrysanthemum frutescens* (GOLDMANN et al., 1968).

L'examen de ces résultats nous a amenée aux conclusions suivantes : les tissus tumoraux obtenus à l'aide des bactéries A₆ et B₆ contiennent une même guanidine, en quantité importante; les tissus inoculés soit avec la souche « Anthémis », soit avec la souche T₃₇ ou IIBV₇ contiennent tous

une guanidine qui n'a pas le même comportement chromatographique que la précédente. Très souvent, à côté de ces deux substances, toujours présentes, on trouve d'autres guanidines mais en quantité beaucoup plus faible et jamais d'une façon constante. La guanidine des tumeurs induites par A₆ ou B₆, en chromatographie sur papier à deux dimensions dans le système de solvants de LEVY et CHUNG, migre sous la tache de la glutamine (photo 6); celle des tumeurs induites par T₃₇, « Anthémis » ou IIBV₇ a

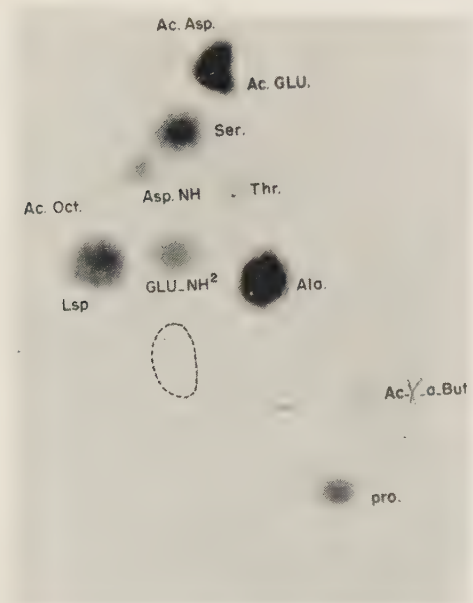


PHOTO 6.

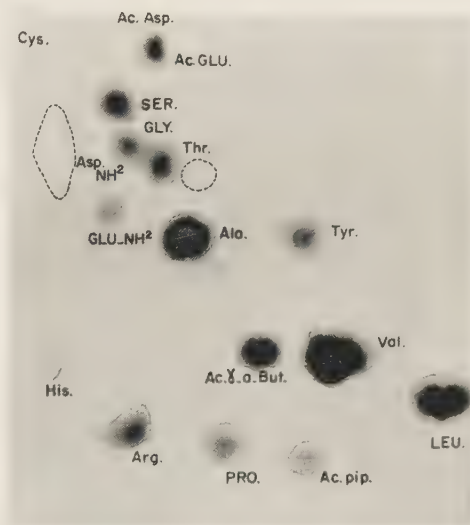


PHOTO 7.

PHOTO 6. — Acides aminés des cultures de tissus de Crown-gall de *Scorzonera hispanica*. Tumeurs induites par la souche A₆. En pointillés : emplacement de la guanidine. Lsp = lysopine.

PHOTO 7. — Acides aminés des cultures de tissus de Crown-gall d'*Opuntia vulgaris*. Tumeurs induites par la souche « Anthémis ». En pointillés : emplacement de la guanidine.

des Rf différents et migre à gauche de l'asparagine; on trouve parfois une seconde tache beaucoup plus faible et plus à droite (photo 7). Sur un chromatogramme de l'analyseur Technicon, la première guanidine sort avant le groupe des leucines (fig. 3); la seconde, à caractère plus acide, sort bien avant sur le chromatogramme en se décomposant en deux pics : l'un qui sort après l'acide glutamique, l'autre avec la valine (fig. 4).

Nous avons finalement cherché si ces guanidines étaient vraiment caractéristiques des tissus de Crown-gall ou si on les retrouvait dans des tumeurs

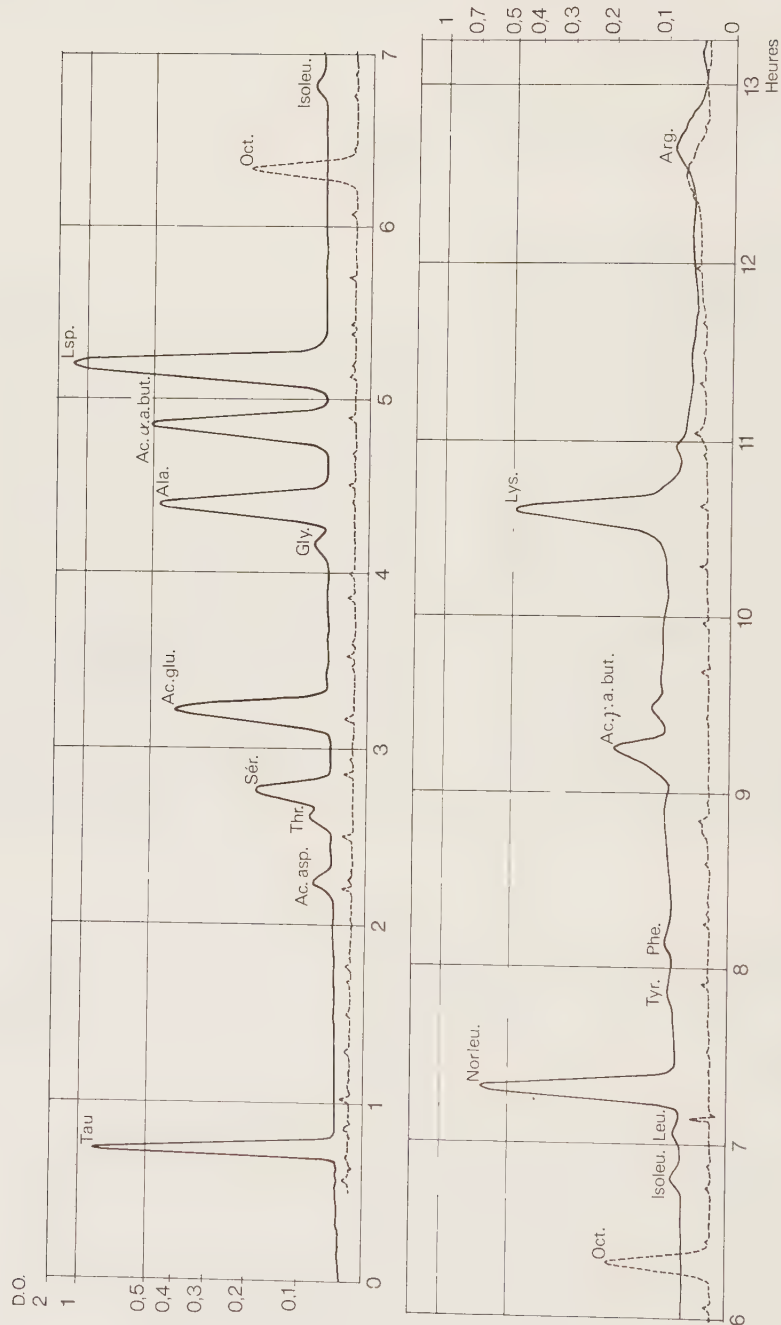


FIG. 3. — Chromatogramme des acides aminés des cultures de tissus de *Scorzonera hispanica*. Tumeurs induites par la souche Ae. En pointillés : les guanidines. Taurine, acide α-aminobutyrique et norleucine sont des acides aminés étalons, Lsp, lysopine.

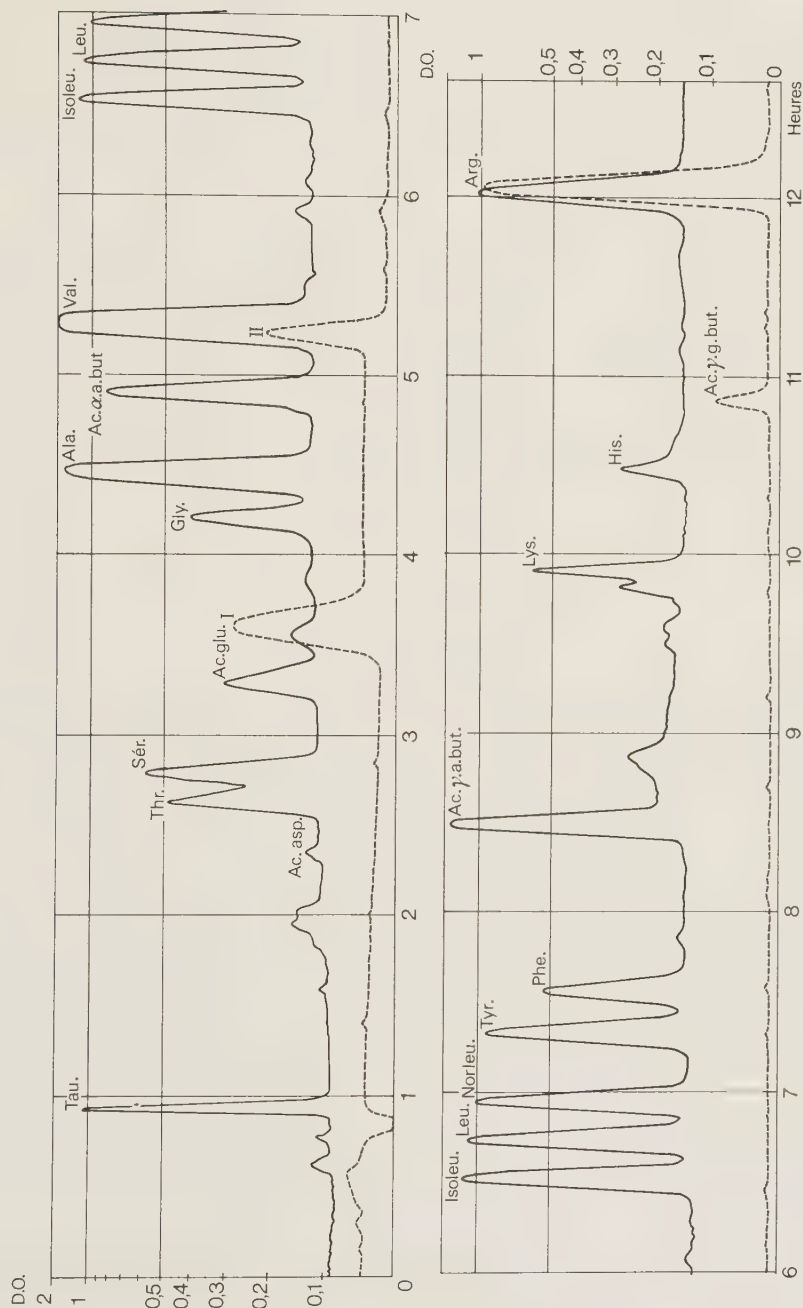


FIG. 4. — Chromatogramme des acides aminés des cultures de tissus de Crown-gall d'*Opuntia vulgaris*. Tumeurs induites par la souche « Anthémis ». En pointillés : les guanidines, Taurine, acide α-aminobutyrique et norleucine sont des acides aminés étalons.

d'origine différente. Nous avons donc examiné des tissus de tumeurs d'origine virologique, tumeurs de *Rumex acetosa* de BLACK, provoquées par le « Wound Tumor Virus », des tumeurs d'origine génétique de l'hybride *Nicotiana glauca* $\times$ *Nicotiana langsdorfii* isolées par WHITE, des tissus anergisés de *Scorzonera hispanica* et de *Parthenocissus tricuspidata*, enfin des tératomes obtenus sur *Pelargonium zonale* par inoculation de la bactérie *Corynebacterium fascians*. Ces différents tissus tumoraux ne contiennent pas de guanidines en dehors de l'arginine.

Nous pouvons dire que la présence des guanidines monosubstituées est spécifique des seuls tissus de Crown-gall; la présence de ces substances traduit un bouleversement profond du métabolisme azoté. D'autres modifications de ce métabolisme étaient déjà connues; en effet LIORET a isolé de ces tumeurs un acide aminé : la lysopine.

N'ayant pu identifier ces guanidines par comparaison avec des composés connus, nous avons décidé de les extraire afin de déterminer leur structure et d'étudier quelles sont les modifications que subit la cellule végétale au cours de la transformation tumorale.

II. — L'OCTOPINE

La guanidine des tumeurs provoquées par les souches A₆ et B₆ d'*Agrobacterium tumefaciens* étant la plus fréquente et la plus abondante dans les cultures dont nous disposions, c'est donc celle-ci que nous avons tenté d'extraire en premier. Nous avons choisi les cultures de tissus de Crown-gall de *Scorzonera hispanica* comme matériel pour l'extraction de cette guanidine; elles proviennent d'une souche isolée par GAUTHERET en 1948; les tissus avaient été inoculés à l'aide de la souche A₆. Ces tumeurs se développent régulièrement et rapidement; elles sont parmi les tissus les plus riches en guanidines que nous ayons analysés. L'objectif était d'obtenir la plus grande quantité de matériel possible dans le minimum de temps; nous avons alors essayé plusieurs solutions minérales afin de déterminer celle qui permettrait la croissance la plus active des tissus : c'est la solution de HELLER, additionnée de glucose à 5 %, de la solution d'oligo-éléments de HELLER et de vitamine B₁, qui a donné les meilleurs résultats. Nous avons constaté que l'addition d'arginine augmentait le rendement en guanidine; ceci nous a conduit à enrichir le milieu en arginine, à raison de 100 mg par litre de milieu. Après divers essais peu satisfaisants en milieu liquide, les cultures ont été faites sur milieu solide, dans des fioles de FOURNEAU de 250 ml, ce qui permettait de cultiver ensemble 5 à 6 colonies dans le même récipient. Les tumeurs étaient prélevées à l'âge de 5 à 6 semaines, lorsqu'elles pesaient de 2 à 3 grammes.

Les guanidines sont retenues sur la résine Dowex 50 avec la fraction acides aminés libres des tissus; il s'agissait donc de séparer la gua-

nidine des autres acides aminés. Nous avons étudié la fixation de cette substance sur différentes résines et les possibilités qu'offrait la chromatographie sur plaque. Nous avons finalement mis au point une technique d'extraction par chromatographie sur colonne de résines échangeuses d'ions.

1. — EXTRACTION

Les acides aminés ont été extraits, à partir de 3,150 kg de tumeurs, selon la technique déjà décrite, par fixation sur résine cationique — la Permutite 50 — et élution à l'ammoniaque M.

A. — Un premier fractionnement a été réalisé sur une colonne d'Amberlite IR 120, type 3, 400-600 mesh (Fischer Scientific Company). En nous inspirant des colonnes préparatives utilisées par STEIN et MOORE, nous avons utilisé une colonne de 6,5 cm de diamètre et de 15 cm de hauteur; le tampon éluant était un tampon citrate-soude de STEIN et MOORE, à pH 5,28, qui permet d'éliminer en bloc les acides aminés les plus acides; la charge de la colonne était de 240 mg d'azote aminé. L'éluat était recueilli sur un collecteur de fractions; une partie aliquote étant prélevée dans chaque tube et analysée par le réactif de ROSENBERG, nous avons ainsi pu repérer et conserver les tubes correspondants à la guanidine.

La solution recueillie a alors été débarrassée des sels du tampon éluant, par passage sur résine cationique AG50WX8 (Biorad); la guanidine se fixe sur cette résine, d'où elle est éluee par l'ammoniaque M. En chromatographiant sur papier l'extrait obtenu, on voit que la guanidine — qui réagit en rouge violacé au réactif de SAKAGUCHI — est encore accompagnée de plusieurs acides aminés, parmi lesquels l'arginine.

B. — La solution est alors placée sur une colonne de résine anionique fortement basique, la Dowex IX₂ (200-400 mesh) suivant la technique de FASOLD et TURBA (1961). La résine est utilisée sous forme carbonate, l'éluant est le carbonate d'ammonium 0,1 M à pH 9. La colonne préparative a 4,5 cm de diamètre et 65 cm de hauteur. Comme précédemment, on repère facilement les fractions qui contiennent la guanidine; on élimine le carbonate d'ammonium par évaporation sous vide. Après cette séparation, la guanidine n'est plus contaminée que par des traces d'arginine et par une substance acide qui réagit à la ninhydrine et qui paraît être l'acide glutamique.

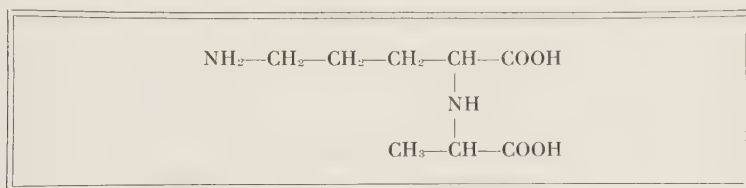
C. — L'extrait sec a l'aspect d'une poudre jaune très soluble dans l'éthanol à 80 % à chaud; après avoir éliminé un résidu insoluble par filtration, on place la solution alcoolique dans un dessiccateur sous vide en présence d'acide sulfurique; après quelques heures, des cristaux blancs apparaissent; ils sont lavés à l'alcool et séchés. Après trois cristallisations successives, nous avons obtenu 66 mg de guanidine. Par chromatographie sur papier dans plusieurs systèmes de solvants, nous avons vérifié que les cristaux obtenus étaient parfaitement purs.

Les propriétés de l'octopine obtenue par synthèse ont été comparées à celles de la guanidine naturelle. Le comportement chromatographique des deux substances dans plusieurs solvants est identique : révélées au réactif de SAKAGUCHI, elles ont toutes deux une coloration rose violacé qui les distingue d'ailleurs nettement des autres guanidines. Sur l'analyseur Technicon, elles donnent un même pic, qui sort juste avant le pic d'isoleucine (fig. 3).

Nous avons préparé les picrates et constaté que les points de fusion sont identiques : 229°-230° C; le point de fusion n'est pas modifié quand on mélange les deux picrates.

D'une manière générale, l'hydrolyse barytique permet d'éliminer le groupement amidine des guanidines. Nous avons suivi, pour cette hydrolyse, la technique de SMITH (SMITH et HORSEWELL, 1960). Dans ces conditions, l'arginine est transformée en ornithine.

Nous avons obtenu, en dégradant la guanidine par la baryte, un acide aminé identique à celui que l'on obtient en traitant l'octopine de la même manière : l'acide octopinique; c'est le produit de déguanidylation de l'octopine :



La détermination du pouvoir rotatoire nous a, d'autre part, montré que la guanidine extraite des tumeurs a la même configuration que celle des invertébrés marins, c'est-à-dire qu'elle correspond à une molécule de L. arginine et de D-alanine. Elle est dextrogyre :

$$(a) \quad \frac{24}{D} = 20^{\circ} 80 \text{ (concentration 2 \% dans l'eau).}$$

La mesure du pouvoir rotatoire a été faite à l'Institut de Chimie des Substances naturelles de Gif-sur-Yvette.

Ces différents résultats prouvent d'une façon irréfutable que la guanidine que nous avons extraite des tumeurs est bien l'octopine (MÉNAGÉ et MOREL, 1964).

L'octopine fut isolée pour la première fois par MORIZAWA, en 1927, de muscles d'Octopus. Elle a été ensuite identifiée chez de nombreux Mollusques céphalopodes, gastéropodes et lamellibranches, et chez un Géphyrien, le Siponcle. Elle n'avait jamais été signalée, jusqu'à présent, dans le règne végétal. Nous ne l'avons jamais trouvée dans un tissu normal; elle

n'a jamais été mise en évidence dans des tumeurs autres que le Crown-gall. Elle semble donc être spécifique des tumeurs induites par *Agrobacterium tumefaciens* et plus spécialement des tumeurs induites par des souches de bactéries bien déterminées, comme nous l'avons déjà vu : les souches B₆ et A₆.

III. — L'ACIDE OCTOPINIQUE

Nous avons d'autre part remarqué, dans les tissus de Crown-gall qui contiennent de l'octopine, la présence constante d'un acide aminé inconnu; il est particulièrement abondant dans les tumeurs de tabac (MÉNAGÉ et MOREL, 1965). En chromatographie sur papier à deux dimensions, dans le système de solvants de LEVY et CHUNG, il a un R_f voisin de celui de l'ornithine (photo 6).

La fraction acides aminés de ces tumeurs renferme également de la lysopine. Comme nous l'avons dit précédemment, nous avons dégradé de

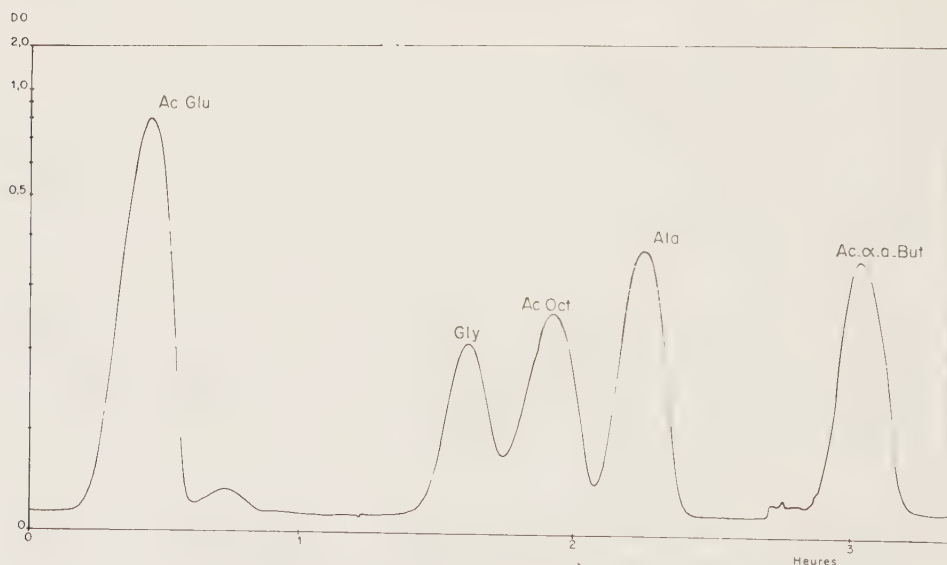


FIG. 5. — Partie d'un chromatogramme des acides aminés de cultures de tissus de Crown-gall de *Nicotiana Tabacum*. Le pic d'acide octopinique est situé entre les pics de glycine et d'alanine.

l'octopine par hydrolyse à la baryte; on obtient ainsi l'acide octopinique. Or, cet acide a, sur les chromatogrammes à deux dimensions sur papier, les mêmes R_f que l'acide aminé inconnu des tissus de Crown-gall.

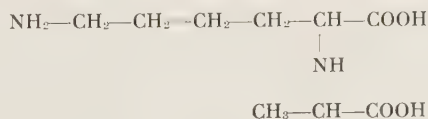
Nous avons alors analysé, par chromatographie sur colonne de résine, à l'aide de l'analyseur Technicon, une solution témoin d'acide octopinique

obtenu à partir d'octopine de synthèse et des solutions d'acides aminés de tissus de Crown-gall. Les deux substances sont éluées exactement dans les mêmes temps et au même endroit sur le chromatogramme, entre la glycine et l'alanine. Il a fallu modifier quelque peu les conditions de la chromatographie pour obtenir une bonne séparation. Dans les conditions où nous travaillons habituellement, une analyse complète d'acides aminés dure 14 heures; le débit de la pompe est de 0,75 ml/mn; les pics de glycine et d'alanine sont accolés et il est très difficile de mettre en évidence le pic de l'acide octopinique, surtout s'il est faible, comme c'est le cas dans les tissus de scorsonère ou de topinambour. Nous avons alors augmenté le temps de l'analyse jusqu'à 22 heures; le débit de la pompe a été réduit à 0,5 ml/mn; le système de tampon était le suivant (il s'agit toujours des tampons citrate de sodium) : tampon pH 2,87, pH 3,80, pH 5,0. La répartition des tampons dans les chambres de l'autograde est celle recommandée par Technicon. Dans ces conditions, l'écart entre les pics de glycine et d'alanine est beaucoup plus important; le pic d'acide octopinique se place juste entre les deux (fig. 5).

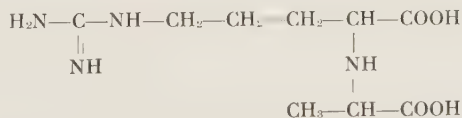
Etant donné la sensibilité de la technique chromatographique, nous pensons pouvoir affirmer que l'acide aminé inconnu des tissus de Crown-gall est bien l'acide octopinique. Cet acide n'avait jamais été signalé, jusqu'à présent, chez les êtres vivants. On le retrouve, en quantité variable, dans les tissus de Crown-gall; il y est toujours associé à l'octopine et à la lysopine.

Il faut noter l'analogie de structure entre la lysopine, l'octopine et l'acide octopinique.

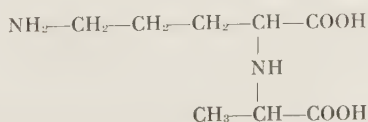
Lysopine :



Octopine :



Acide octopinique :



Trois acides aminés basiques : la lysine, l'arginine et l'ornithine, sont substitués sur l'azote α -aminé par un même radical : 2-propionyl; dans les trois cas, la configuration est la même (L-D). On ne les retrouve pas dans les tissus sains correspondants aux tissus de Crown-gall; ils apparaissent comme la conséquence de la transformation tumorale.

IV. — LA NOPALINE

Nous avons vu que les tumeurs induites par les souches T₃₇, « Anthémis » et IIBV₇ d'*Agrobacterium tumefaciens* contiennent — en plus de l'arginine — une guanidine différente de l'octopine; elles se différencient aussi des « tumeurs à octopine » par le fait qu'elles ne renferment ni acide octopinique ni lysopine. Pour isoler cette guanidine, nous avons utilisé des tissus de Crown-gall d'*Opuntia vulgaris* parce que, au début de ce travail, c'étaient les seules tumeurs que nous possédions qui contenaient cette substance. Ceci nous a décidés à appeler cette guanidine inconnue « Nopaline », de Nopal, nom commun de l'*Opuntia vulgaris*.

Les cultures de tissus de Crown-gall d'*Opuntia* proviennent de tissus de raquettes d'*Opuntia vulgaris*, inoculés par G. MOREL, en 1946, avec la souche « Anthémis ». Les tissus sont cultivés sur milieu de KNOP contenant 5 % de glucose, les micro-éléments de HELLER et enrichi en arginine (100 mg/l). Ici également, nous avons constaté qu'on augmentait la concentration en guanidine en ajoutant de l'arginine au milieu de culture. La teneur en nopaline du tissu d'*Opuntia* étant plus faible que la teneur en octopine des tissus de scorsonère, l'extraction de cette substance a nécessité une grande quantité de matériel; il nous a paru plus commode de cultiver ces tissus dans des bouteilles à lait d'un litre plutôt que dans des tubes de culture classiques. Dans les bouteilles couchées et contenant chacune 200 ml de milieu, on peut facilement repiquer de 25 à 30 colonies.

Les tissus sont prélevés après 6 semaines de culture; la récolte par bouteille est environ de 50 g. Les tumeurs sont d'un blanc translucide, elles sont molles et très friables.

1. — EXTRACTION

Cette guanidine, comme l'octopine, est extraite avec l'ensemble des acides aminés des tissus, selon la technique habituelle. Pour des raisons de commodité, parce qu'il est plus facile de les conserver de cette manière, les tissus prélevés sont aussitôt lyophilisés; ils sont ensuite, au moment de l'extraction, broyés au Virtis dans l'eau à 3° C avant d'être mis en contact avec la Permutite 50.

Une analyse de la solution d'acides aminés, réalisée à l'aide de l'appareil Technicon, montre deux pics réagissant au diacétyle- α -naphtol, reliés par un plateau, c'est-à-dire par une augmentation de la ligne de base (fig. 4).

La première substance (pic I) sort après l'acide glutamique; la seconde (pic II) après la valine. Le second pic correspond à la nopaline. L'importance du premier pic est très variable; elle dépend du temps de contact de la solution avec la colonne de résine avant le départ de l'analyse; ce comportement spécial semble indiquer que le produit principal se décompose au contact de la colonne de résine. La nopaline est donc une molécule fragile en milieu acide; le simple contact avec les groupes $-\text{SO}_3\text{H}$ de la résine Dowex 50 suffit à la décomposer partiellement. Cette constatation nous a conduite à rejeter la méthode employée pour extraire l'octopine. En essayant divers procédés de purification, nous avons constaté que la Séphadex permettait de séparer la guanidine des acides aminés qui l'accompagnent.

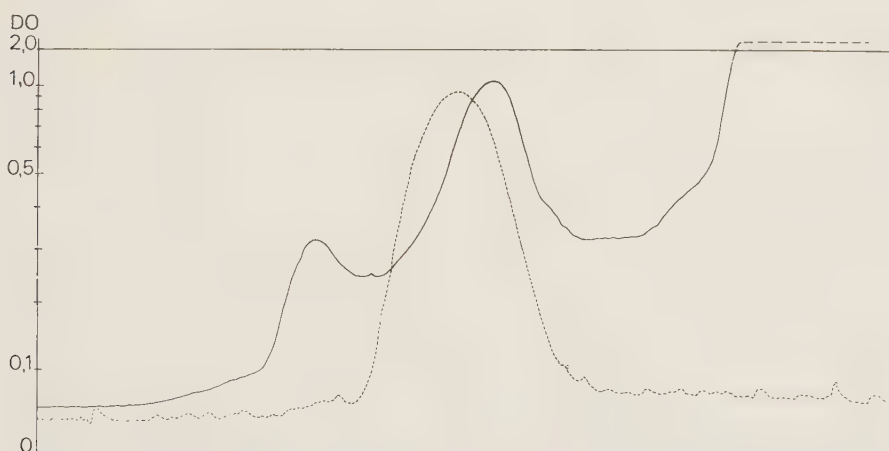


FIG. 6. — Chromatographie de la nopaline sur Séphadex G 10. Elle sort juste avant la masse des acides aminés. *En pointillés* : la guanidine; *en trait plein* : substances réagissant à la ninhydrine.

A. — Nous avons donc utilisé tout d'abord une colonne de Séphadex G 10 de 3,5 cm de diamètre et de 105 cm de hauteur; on prépare la Séphadex G 10-120 (Pharmacia) en la laissant simplement gonfler une nuit dans l'eau. La solution d'acides aminés, qui contient de 8 à 10 % de guanidines, est déposée au sommet de la colonne; la charge optimale est de 400 μM d'acides aminés, soit environ 50 μM de guanidines. L'élution se fait à l'eau. Une partie de l'effluent (environ 1/25) est analysée automatiquement sur le Technicon, à la ninhydrine et au réactif des guanidines; l'autre partie est recueillie sur un collecteur de fractions. On a séparé de cette manière la nopaline de la masse principale des acides aminés (fig. 6).

La nopaline sort de la colonne après 6 heures; elle est contaminée par

des substances réagissant à la ninhydrine — qui correspondent certainement à de petits peptides —, mais elle sort juste avant le bloc des acides aminés. On recueille sur le collecteur les fractions qui correspondent à la nopaline; les dernières fractions sont souvent contaminées; une seconde séparation sur la Séphadex G 10 est alors nécessaire.

B. — Pour une purification plus avancée de la nopaline, encore contaminée, on a utilisé une colonne de Séphadex anionique, la DEAE-Séphadex A 50 (Pharmacia); elle est préparée sous forme acétate d'après Pharmacia. La colonne a 3 cm de diamètre et 45 cm de hauteur. L'élution se fait selon CARNEGIE (1963) avec l'acide acétique 0,1 N puis 1 N. La charge optimale est de 50 μ M de guanidine. Une partie de l'effluent est analysée au Technicon; l'autre est recueillie sur le collecteur de fractions. L'analyse dure environ 10 heures. Après cette séparation, la nopaline n'est plus contaminée qu'en très faible proportion par une substance réagissant à la ninhydrine (fig. 7).

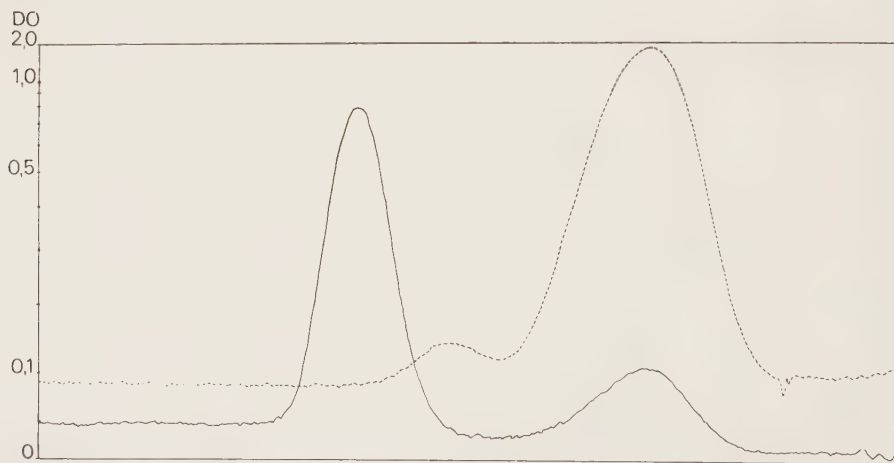


FIG. 7. — Chromatographie de la nopaline sur DEAE Séphadex A 50.
En pointillés : la guanidine; en trait plein : substances réagissant à la ninhydrine.

Les fractions correspondant au pic de guanidine ont été évaporées à sec sous vide; l'extract a été repris plusieurs fois par l'eau. On obtient finalement une poudre jaune. Une extraction, en octobre 1967, à partir de 6 kg de tissus, a donné 489 mg de nopaline non cristallisée.

C. — La poudre obtenue se dissout très difficilement dans 150 ml d'eau; la solution, filtrée sur millipore pour éliminer les impuretés insolubles, a été concentrée sous vide jusqu'à 3 ou 4 ml; on ajoute 5 ml d'éthanol absolu : des cristaux très fins apparaissent aussitôt. Après une nuit à 4° C, on recueille 284,8 mg de cristaux gris-jaune; la seconde cristallisation donne des cristaux encore colorés; une décoloration de la solution par la norite permet d'obtenir, après la troisième cristallisation, 158,2 mg de cristaux

parfaitement blancs. L'analyse chromatographique des cristaux montre qu'ils ne renferment plus de contaminants réagissant à la ninhydrine ou au diacétyl- α -naphtol. Ils renferment toutefois une certaine quantité d'eau (5,6 %) qui ne disparaît qu'après plusieurs heures de chauffage sous vide à 100° C et doit correspondre à une molécule d'eau de cristallisation.

2. — ANALYSE ET STRUCTURE

L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants (l'analyse a été faite au Service de Micro-analyse de Gif-sur-Yvette) :

C %	43,1 43
H %	6,6 6,6
N %	18 17,9
O %	31,1 31,1

Cette analyse est en accord avec une formule en $C_{11}H_{19}O_6N_4$.

Il n'a pas été possible d'identifier cette substance à une molécule déjà décrite; d'ailleurs son comportement bien particulier sur les colonnes de résine la distingue de toutes les guanidines actuellement connues.

La nopaline réagit au réactif de SAKAGUCHI (sur papier, elle a une coloration rose violacé qui rappelle celle de l'octopine); la molécule comprend donc un groupement guanidique monosubstitué; elle ne réagit pas à la ninhydrine; elle ne contient donc pas de radical aminé libre. C'est une guanidine acide étant donné son ordre de sortie sur les chromatogrammes de l'auto-analyseur Technicon; elle est plus acide que l'octopine, ce qui laisse supposer la présence d'au moins trois fonctions carboxyliques. L'hydrolyse acide, par HCl 6 N à 100° C, ne libère pas de radical NH_2 ; il ne s'agit donc pas d'un peptide.

A. — Hydrolyse acide.

Nous avons vu que la nopaline se décompose en milieu acide; nous avons donc essayé d'élucider le processus de cette décomposition. Si on analyse au Technicon l'hydrolysât acide de la nopaline, on constate, qu'après 3 heures d'hydrolyse, le pic de nopaline (II) a presque entièrement disparu;

par contre, le pic I — déjà considéré comme le produit de décomposition de la nopaline sur la résine — devient beaucoup plus important. Il apparaît en outre une autre guanidine, pic III, qui sort juste après la nopaline (fig. 8). La dégradation apparaît donc comme très facile à réaliser. On la constate d'ailleurs par simple passage d'une solution de nopaline sur une colonne de résine Dowex 50; elle ne touche pas le groupement guanidique, elle ne libère pas de radical —NH_2 .

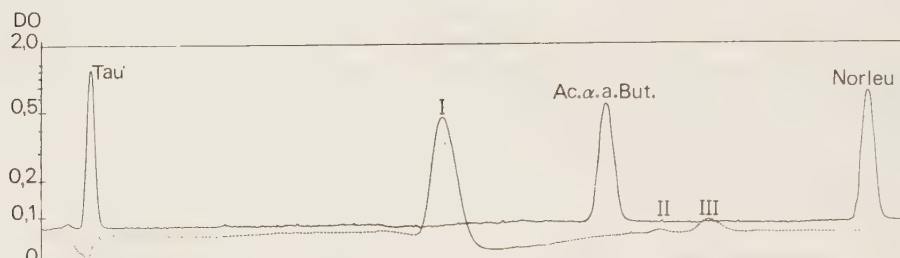


FIG. 8. — Hydrolyse chlorhydrique de la nopaline (pic II).
Temps d'hydrolyse : 3 heures.
Taurine, acide α -aminobutyrique et norleucine sont des étalons.

Après une hydrolyse de 18 heures, les résultats ont peu varié : le pic de nopaline a presque entièrement disparu, le pic III a augmenté. Après 48 heures, le pic III est devenu encore plus important (fig. 9).

Ainsi, en milieu acide, la nopaline donne facilement une autre guanidine plus acide (I); nous en avons isolé quelques micromoles de la manière suivante : 5 mg de nopaline sont hydrolysés par 5 ml HCl 6 N pendant

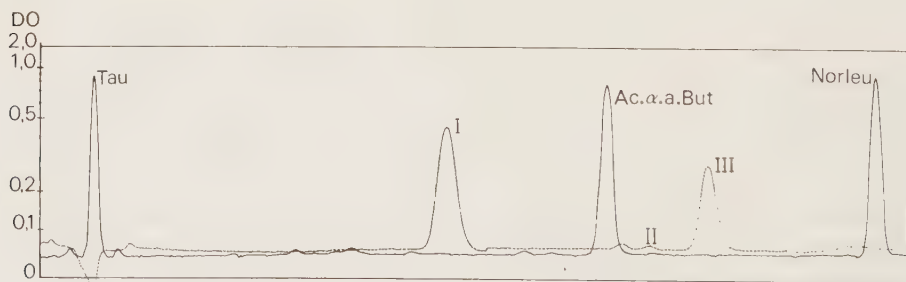


FIG. 9. — Hydrolyse chlorhydrique de la nopaline (pic II).
Temps d'hydrolyse : 48 heures.
Taurine, acide α -aminobutyrique et norleucine sont des étalons.

18 heures à 110°C . L'hydrolysate est évaporé à sec sous vide et repris plusieurs fois par l'eau pour éliminer HCl. On sépare alors la nopaline (pic I) sur la colonne d'Amberlite modifiée selon PADIEU et MALEKNIA (1965); la résine passe de la forme Na^+ à la forme H^+ par lavage avec HCl 2 N puis

elle est équilibrée avec un tampon pyridine - acide formique. On peut, dans ces conditions, utiliser pour l'élution un système de tampons volatils pyridine - acide formique, très commodes quand on veut récupérer de très petites quantités de substance. Après évaporation du tampon, on recueille la nopaline hydrolysée (pic I) parfaitement pure. Cette guanidine est alors soumise à l'hydrolyse chlorhydrique pendant 48 heures à 110° C. Elle se transforme en une autre guanidine (pic III) plus basique que la nopaline.

La nopaline se transforme donc, en milieu acide, en une autre guanidine (I); celle-ci donne à son tour, mais plus difficilement, une troisième guanidine (pic III), plus basique que la nopaline. Ces guanidines ne correspondent pas à des composés connus.

B. — Hydrolyse alcaline.

Nous avons appliqué la méthode classique d'hydrolyse par la baryte qui permet d'éliminer le radical guanidine. La nopaline a été chauffée à reflux pendant trois heures en présence de baryte à 16 %; après ce temps, le groupement guanidique a complètement disparu. L'analyse au Technicon montre alors la présence de plusieurs composés acides, réagissant à la ninhydrine, dans la région de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. L'un est d'ailleurs de l'acide glutamique, les autres n'ont pu être identifiés. L'existence de ces nombreux petits pics est la preuve d'une décomposition progressive de la nopaline; nous n'avons pas pu interpréter jusqu'à présent ces résultats.

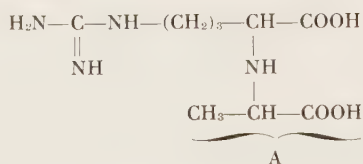
C. — Oxydation permanganique.

Nous avons ensuite étudié l'oxydation de la molécule par MnO_4K à pH 7 (HARDEGGER et al., 1963). Pour cela, 5 mg de nopaline ont été dissous dans 1 ml d'eau; on ajoute 1 ml d'une solution de MnO_4K à 3 mg par ml; après deux heures d'oxydation à la température du laboratoire, on filtre le précipité de Mn_2O_3 sur verre fritté; la solution passe sur une petite colonne de Permutite 50; les produits d'oxydation de la nopaline fixés sur la résine sont élués à l'ammoniaque M et analysés au Technicon. On constate que la guanidine a complètement disparu; il s'est formé de l'acide glutamique, de l'acide γ -guanidobutyrique et de l'arginine; oxydée dans les mêmes conditions, l'octopine donne de l'alanine, de l'acide γ -guanidobutyrique, de l'arginine. Ceci nous permet de penser que la nopaline serait le produit de condensation de l'arginine et de l'acide α -cétoglutarique, selon un schéma identique à celui de l'octopine. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par spectrométrie de masse, par D. THOMAS, à l'Institut de Chimie des Substances naturelles de Gif-sur-Yvette.

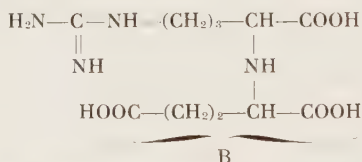
3. — VÉRIFICATION DE LA STRUCTURE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

L'oxydation permanganique de la nopaline nous a donc permis de proposer, par comparaison avec les résultats de l'oxydation de l'octopine (I_a), la structure suivante (I_b) :

Octopine (I_a) :

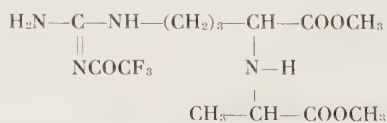


Nopaline (I_b) :

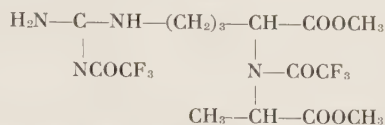


La confirmation de cette structure a été apportée par une étude de spectrométrie de masse. Pour cela, la nopaline a été traitée successivement par l'anhydride trifluoracétique et par le diazométhane. On a ainsi obtenu un mélange des esters méthyliques de mono- et de ditrifluoracétate de poids moléculaires 442 et 538. Dans des conditions identiques, l'octopine produit un mélange de monotrifluoracétate de poids moléculaire 370 et d'un ditrifluoracétate de poids moléculaire 466, correspondants aux formules ci-après :

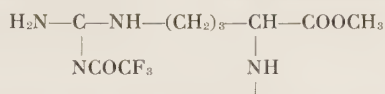
Monotrifluoracétate d'octopine, P.M. 370 :



Difluoracétate d'octopine, P.M. 466 :



Le pic le plus intense au-dessus de m/e 150 dans les spectres de masse des mélanges de produits issus de la nopaline et de l'octopine se trouve à m/e 283. Des mesures de masse à haute résolution ont montré que la composition élémentaire de ce fragment est $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3\text{F}_3$; il correspond donc à la partie arginique commune aux dérivés monotrifluoracétyles de l'octopine et de la nopaline :



L'octopine et la nopaline diffèrent donc seulement par les parties A et B des formules (I_a) et (I_b). La différence de masse de 72 unités entre les esters méthyliques des trifluoracétates de ces deux composés et l'isolement d'acide glutamique par oxydation de la nopaline confirment donc la structure (I_b) que nous avons proposée (GOLDMANN et al., 1969).

V. — CONCLUSION

La structure de la nopaline est voisine de celle de l'octopine; ces deux guanidines ne diffèrent que par la nature du radical lié à l'azote en α de l'arginine : radical glutarique dans le cas de la nopaline, radical propionique pour l'octopine.

On peut rapprocher de cette substance nouvelle la saccharopine ou α -N-glutaryl-2-lysine, qui est le produit de condensation de la lysine et de l'acide α -cetoglutarique. Découverte chez *Saccharomyces* (DARLING et LARSEN, 1961), elle a été mise en évidence, depuis, chez des micro-organismes (SAUNDERS et BROQUIST, 1966) et dans des tissus animaux et humains (HIGASHINO et al., 1965; HUTZLER et DANCIS, 1968).

Rappelons que nous avons cru, tout d'abord, que la nature particulière de la guanidine trouvée dans les tumeurs d'*Opuntia vulgaris* n'était qu'une conséquence du métabolisme spécial des Cactées. Espérant retrouver le phénomène chez d'autres plantes de cette famille, G. MOREL avait obtenu des tumeurs d'*Epiphyllopsis gaerthneriana* à l'aide de la souche B₆ d'*Agrobacterium tumefaciens*, mais nous avons constaté que ces tumeurs renfermaient de l'octopine. C'est alors qu'il fut trouvé de la nopaline dans les tératomes de tabac de BRAUN, tumeurs provoquées par la souche T₃₇. Cette même souche fut inoculée à d'autres hôtes : *Vicia sativa*, *Datura stramonium* et *Canavalia ensiformis*. Toutes les tumeurs obtenues renfermaient de la nopaline. Il se confirmait ainsi que la nature des guanidines produites de manière constante dans les tissus tumoraux est indépendante de l'hôte, mais semble spécifique de la souche bactérienne utilisée pour provoquer la transformation.

CHAPITRE III

MÉTABOLISME DE L'ARGININE DANS LES TISSUS DE CROWN-GALL

La présence, dans les tissus de Crown-gall, des guanidines spécifiques que nous avons isolées, l'octopine et la nopaline, indique un métabolisme anormal de l'arginine. Aussi, après avoir identifié ces substances, nous avons tout naturellement songé à faire une étude comparée du métabolisme de cet amino-acide dans les tissus normaux et dans les tissus de Crown-gall cultivés dans des conditions identiques.

I. — MODIFICATION DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE DANS LES TISSUS DE CROWN-GALL

Chez les végétaux, il semble que la dégradation de l'arginine par l'arginase soit une réaction largement répandue; la première étude que nous avons réalisée a donc été une comparaison de l'activité de cette enzyme dans les tissus sains et les tissus de Crown-gall.

1. — TISSUS DE *DATURA STRAMONIUM*

Nous savions déjà, grâce aux travaux de JINDRA et STABA (1968), que dans les cultures de tissus normaux de *Datura stramonium* l'arginine est hydrolysée par l'arginase; les premiers tissus que nous avons étudiés ont donc été les tissus normaux et les tissus de Crown-gall de *Datura stramonium* obtenus par inoculation de la souche B₆. Les tissus sains ont été cultivés sur le milieu mis au point par STABA spécialement pour cette souche : il s'agit du milieu de MURASHIGE et SKOOG, auquel on ajoute de l'inositol 5 %, un mélange de vitamines et du 2-4-D.10⁻⁶. Les tissus tumoraux sont cultivés sur le milieu de SKOOG; ils poussent avec une grande exubérance. Ils sont prélevés à l'âge de 3 semaines. Les mesures de l'activité arginasique dans les deux types de tissus ont été réalisées dans les

conditions décrites par JINDRA et STABA (1968). Plusieurs séries de mesures ont été faites sur plusieurs lots de tissus toujours prélevés au même âge. Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant; ils sont exprimés en micromoles d'urée libérées par un extrait enzymatique correspondant à 1 g de matière sèche.

Datura stramonium.

TEMPS D'INCUBATION	TISSUS SAINS	TISSUS DE CROWN-GALL INDUITS PAR LA SOUCHE B ₆
6 heures	12,2	0,54
15 heures	20,2	1,27
24 heures	23,3	2,63
48 heures	21,7	0,78

L'urée apparaît après 6 heures d'incubation : on constate la concentration maximum après 24 heures. Nous n'avons pas déterminé pour quelles raisons des temps d'incubation aussi longs sont nécessaires. Un dosage de l'extrait seul — sans le substrat — a permis de vérifier l'absence d'urée; d'autre part, les essais correspondants à l'arginine seule, sans extrait, ne contiennent pas d'urée, même après 24 heures.

Ce tableau montre que l'activité de l'arginase, après 24 heures d'incubation, est neuf fois plus faible dans les tissus de Crown-gall que dans les tissus sains. Dans toutes les séries de mesures que nous avons effectuées, l'activité de l'enzyme dans les tissus de Crown-gall est environ dix fois plus faible. Nous avons voulu vérifier si cette baisse d'activité arginasique dans les tissus de Crown-gall de *datura* était liée à la transformation tumorale, en étudiant de la même manière d'autres tissus tumoraux.

2. — *TISSUS DE NICOTIANA TABACUM*

Nous avons choisi les cultures de tissus de *Nicotiana Tabacum*, tissus sains, tissus de Crown-gall induits par la souche A₆, tératomes induits par la souche T₃₇. Ces tissus, cultivés dans des conditions identiques sur le milieu de SKOOG, sont prélevés à l'âge de 4 à 5 semaines. Les conditions d'extraction, les temps d'incubation, sont les mêmes que précédemment. Nous avons retrouvé des résultats comparables à ceux obtenus avec les tissus de *datura*; les mesures montrent que l'activité de l'arginase dans les tissus de Crown-gall induits par A₆ est en moyenne six fois plus faible que celle des tissus sains. Les résultats d'une série de mesures figurent dans le tableau suivant :

Nicotiana Tabacum

TEMPS D'INCUBATION	TISSUS SAINS	TISSUS DE CROWN-GALL INDUITS PAR LA SOUCHE A ₆
6 heures	21,8	5,5
15 heures	22,7	7
24 heures	45,4	6,5
48 heures	32,5	10,6

Les mesures réalisées avec les tératomes de tabac, dans les mêmes conditions, ont montré que, dans ce cas, l'activité de l'arginase est trois à quatre fois plus faible que celle des tissus sains.

Nous remarquons ainsi, que ce soit chez *Datura stramonium* ou chez *Nicotiana Tabacum*, une diminution très nette de l'activité de l'arginase dans les tissus de Crown-gall par rapport à celle des tissus sains. On peut se demander, alors, si la différence que nous constatons est due à une modification de la synthèse de l'enzyme ou bien à une modification de son activité; une étude plus précise et plus fine de l'arginase permettra d'aborder cette question. Quoi qu'il en soit, cette baisse d'activité laisse prévoir que l'arginine est engagée, dans les tissus de Crown-gall, dans une autre voie métabolique.

II. — BIOSYNTHÈSE DES GUANIDINES

1. — RÔLE DE L'ARGININE DANS LA BIOSYNTHÈSE
DES GUANIDINES

Il était logique de penser que, dans les tissus de Crown-gall, l'arginine non dégradée par l'arginase devait participer à d'autres réactions. En raison des relations structurales étroites qui unissent l'arginine, l'octopine et la nopaline, nous avons alors recherché le rôle de l'arginine dans la biosynthèse de ces guanidines.

Pour suivre les réactions auxquelles participe l'arginine, nous avons réalisé des expériences d'incorporation d'arginine radioactive dans les deux types de tissus, sains et tumoraux.

Les tissus, prélevés à l'âge de 3 ou 4 semaines selon les cas, sont placés dans des fioles de FOURNEAU de 125 ml en milieu liquide; le milieu — 10 ml par fiole — est celui sur lequel les tissus sont cultivés habituellement; il contient en plus 10 μ C d'arginine radioactive d'origine biologique (C.E.A.) marquée uniformément sur tous les carbones et dont l'activité spécifique

est de 117 mC/mM. Chaque fiole contient environ 6 g de tissus. Les temps d'incorporation de l'arginine sont de 4 jours. Après ce temps, les tissus sont broyés et les métabolites extraits selon les techniques déjà décrites et leur radioactivité mesurée. La répartition de la radioactivité dans les acides aminés a spécialement attiré notre attention; dans ce cas, nous avons identifié les acides aminés radioactifs, à la fois par autoradiographie des chromatogrammes sur papier et grâce aux courbes de radioactivité obtenues par analyse des éluats des colonnes analytiques Technicon au compteur à scintillation. Cette dernière méthode, extrêmement fine, a permis de mettre en évidence des pics de radioactivité correspondant à des composés non décelables par autoradiographie et dont la nature n'a pas toujours pu être déterminée. Plusieurs souches de tissus ont ainsi été étudiées : ce sont les cultures de tissus de *Nicotiana Tabacum*, de *Datura stramonium* et de *Scorzonera hispanica*; nous avons également examiné les cultures de tissus de Crown-gall d'*Opuntia vulgaris*.

A. — Résultats.

La radioactivité incorporée dans les différents métabolites a été mesurée. Nous avons étudié en détail la fraction acides aminés.

a) Tissus de *Nicotiana Tabacum*. — La répartition de la radioactivité dans les différents métabolites est rapportée dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE INCORPORÉE
Nicotiana Tabacum.

FRACTION ÉTUDIÉE	TISSU SAIN	TISSU DE CROWN-GALL INDUIT PAR A ₆	TÉRATOME INDUIT PAR T ₃₇
	%	%	%
Acides aminés	30,7	30,5	21,7
Acides organiques	1,7	2,5	2,1
Fraction neutre	10,6	8,8	10,5
CO ₂	5,8	7,1	7,3
Hydrolysât des protéines du culot	34,2	32,4	31,8
Hydrolysât des protéines solubles	17	18,9	29,6
Radioactivité incorporée dans les tissus ..	63	73	82,1

La répartition de la radioactivité dans les acides aminés est donnée dans le tableau V.

Les dessins des courbes de radioactivité obtenues pour les trois types de tissus (fig. 10, 11 et 12) sont une illustration des résultats décrits ci-dessus.

TABLEAU V. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LA FRACTION ACIDES AMINÉS
Nicotiana Tabacum

ACIDE AMINÉ RADIOACTIF	TISSU SAIN	TISSU DE CROWN-GALL INDUIT PAR A ₆	TÉRATOME INDUIT PAR T ₃₇
	%	%	%
Arginine	80,7	33,5	5,5
Octopine	0	61,7	Traces.
Nopaline	0	0	73,3
Acide octopinique	0	0,3	0
Acide γ -aminobutyrique	6,2	1,5	2,7
Acide γ -guanidobutyrique	2,9	1,5	0,99
Acide glutamique	0,9	0,28	0,92
Acide aspartique	0	Traces.	0
Glutamine	8,3	0,3	7,3
Proline	1	0,4	1,7
Ornithine	Traces.	0	0
Alanine	0	0	7,5

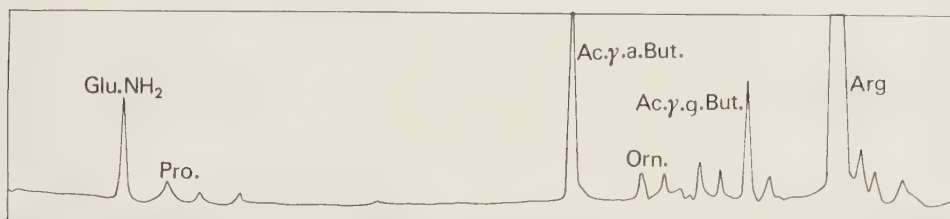


FIG. 10. — Acides aminés radioactifs des tissus sains de *Nicotiana Tabacum* cultivés 4 jours en présence d'arginine ¹⁴C.

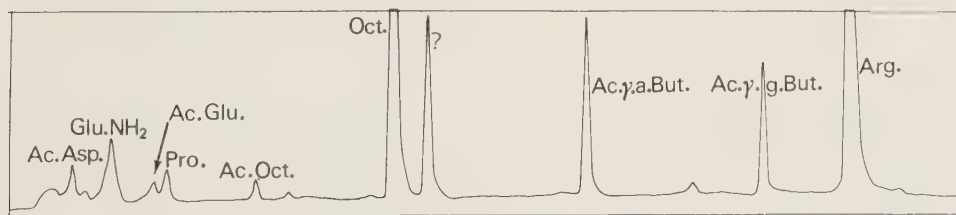


FIG. 11. — Acides aminés radioactifs des tissus de Crown-gall de *Nicotiana Tabacum* (induits par la souche A₆) cultivés 4 jours en présence d'arginine ¹⁴C.

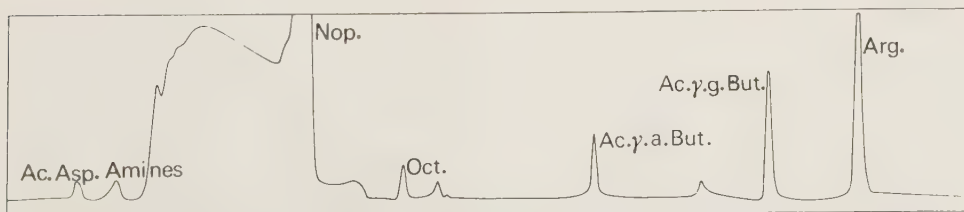


FIG. 12. — Acides aminés radioactifs des tératomes de *Nicotiana Tabacum* (induits par la souche T₃₇) cultivés 4 jours en présence d'arginine ¹⁴C.

b) **Tissus de *Datura stramonium*.** — La répartition de la radioactivité dans les différents métabolites est rapportée dans le tableau VI.

TABLEAU VI. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE INCORPORÉE DANS LES TISSUS
Datura stramonium.

FRACTION ÉTUDIÉE	TISSU SAIN	TISSU DE CROWN-GALL INDUIT PAR B ₆
	%	%
Acides aminés	18,9	21,4
Acides organiques	0,8	0,9
Fraction neutre	14,7	9
CO ₂	4,9	14
Hydrolysât des protéines du culot	42	38,6
Hydrolysât des protéines solubles	20,5	15
Radioactivité incorporée dans les tissus..	85,3	94

La répartition de la radioactivité dans les acides aminés est donnée dans le tableau VII.

TABLEAU VII. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LA FRACTION ACIDES AMINÉS
Datura stramonium.

ACIDE AMINÉ RADIOACTIF	TISSU SAIN	TISSU DE CROWN-GALL INDUIT PAR B ₆
	%	%
Arginine	73	35,4
Octopine	0	47,4
Acide γ -aminobutyrique	5,8	7,2
Acide γ -guanidobutyrique	Traces.	0
Acide glutamique	0,4	Traces.
Glutamine	0,4	0
Valine	0	7,7
Ornithine	Traces.	0
Inconnu 1 (1)	1,7	0
Inconnu 2 (1)	2,1	0
Inconnu 3 (1)	5,9	0
Inconnu 4 (1)	8,1	0
Inconnu 5 (1)	2	0

(1) Ces inconnus correspondent à des composés qui ne réagissent pas à la ninhydrine et qui n'ont pu être identifiés.

c) **Tissus de *Scorzonera hispanica*.** — La répartition de la radioactivité dans les différents métabolites est rapportée dans le tableau VIII.

La répartition de la radioactivité dans la fraction acides aminés est donnée dans le tableau IX.

TABLEAU VIII. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE INCORPORÉE DANS LES TISSUS
Scorzonera hispanica.

FRACTION ÉTUDIÉE	TISSU SAIN	TISSU DE CROWN-GALL INDUIT PAR A ₀
	%	%
Acides aminés	29,9	35
Acides organiques	1,7	0,8
Fraction neutre	6,7	13
CO ₂	0,8	2,9
Hydrolysats des protéines du culot	33,8	40,3
Hydrolysats des protéines solubles	18,7	6,5
Radioactivité incorporée dans les tissus..	94,5	83,8

TABLEAU IX. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE INCORPORÉE DANS LES TISSUS
Scorzonera hispanica.

ACIDE AMINÉ RADIOACTIF	TISSU SAIN	TISSU DE CROWN-GALL INDUIT PAR A ₀
	%	%
Arginine	35,6	7,42
Octopine	0	78
Acide γ -aminobutyrique	7,87	0,7
Acide γ -guanidobutyrique	40,1	12
Acide glutamique	0,6	0,4
Acide aspartique	0,2	0
Glutamine	1,3	Traces.
Alanine	0,3	0
Proline	8,8	0,66
Inconnu 1 (1)	0,3	0
Inconnu 2 (1)	4,3	0

(1) Ces inconnus correspondent à des composés qui ne réagissent pas à la ninhydrine et qui n'ont pu être identifiés.

B. — Conclusion.

L'examen de ces expériences d'incorporation d'arginine radioactive conduit aux résultats suivants : dans les tissus sains comme dans les tissus de Crown-gall, la majeure partie de l'arginine absorbée (50 à 60 %) est incorporée dans les protéines, plus particulièrement dans les protéines du culot de centrifugation; elle est également intégrée dans le pool des acides aminés qui représente de 20 à 30 % de la radioactivité. Une fraction du squelette carboné de l'arginine est utilisée à la biosynthèse de certains acides organiques et sucres : cette fraction correspond à environ 8 % de la radioactivité. Une partie de la radioactivité se retrouve également dans le CO₂ libéré lors de la respiration des tissus. L'origine de ce CO₂ marqué

pourrait être expliquée par deux types de réactions : utilisation de l'urée libérée par action de l'arginase et réaction de décarboxylation qui intervient dans la biosynthèse de l'acide γ -guanidobutyrique.

C'est l'étude de la répartition de la radioactivité dans la fraction acides aminés qui a fait apparaître d'importantes différences entre tissus sains et tissus tumoraux.

a) **Tissus sains.** — Il faut tout d'abord remarquer que dans les tissus normaux de tabac et de datura, l'arginine est métabolisée lentement : en effet, elle représente encore, après 4 jours, 70 à 75 % de la radioactivité incorporée dans la fraction acides aminés. Dans les tissus de scorsonère, le métabolisme est plus actif; l'arginine ne représente plus que 35,8 % de la radioactivité. Dans les tissus sains de scorsonère, le principal produit de dégradation de l'arginine est l'acide γ -guanidobutyrique; il est admis que cette dégradation passe par l'intermédiaire de l'acide α -cété- δ -guanido-valérique; une L-amino-acide oxydase doit être présente dans ces tissus; chez le tabac, l'acide γ -guanidobutyrique est également un produit du métabolisme de l'arginine. L'acide γ -aminobutyrique, qui est également marqué chez le tabac et chez le datura, doit provenir de la déguanidylation de l'acide γ -guanidobutyrique.

D'autre part, l'activité de l'arginase, que nous avons déjà mise en évidence *in vitro*, se manifeste par l'apparition de traces d'ornithine marquée chez le tabac et le datura, ainsi que par la présence de radioactivité dans l'acide glutamique, les amines et la proline.

b) **Tissus de Crown-gall.** — Dans les tissus de Crown-gall, le métabolisme de l'arginine est beaucoup plus intense; ainsi, après 4 jours, l'arginine ne représente plus, chez le datura, que 35 % de la radioactivité incorporée dans la fraction acides aminés; dans le tératome de tabac — exemple le plus caractéristique —, elle ne représente plus que 5,5 % de la radioactivité.

Dans tous les cas et c'est le fait le plus remarquable, les guanidines — octopine et nopaline — sont, et de loin, les métabolites les plus marqués; la radioactivité incorporée dans ces guanidines est rapportée dans le tableau XII.

TABLEAU XII. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LA FRACTION ACIDES AMINÉS

TISSUS DE CROWN-GALL ÉTUDIÉS	OCTOPINE	NOPALINE
Crown-gall de <i>Datura stramonium</i> induit par B ₆	47 %	—
Crown-gall de <i>Nicotiana Tabacum</i> induit par A ₆	61,7 %	—
Crown-gall de <i>Scorzonera hispanica</i> induit par A ₆	78 %	—
Tératome de <i>Nicotiana Tabacum</i> induit par T ₃₇	—	73,3 %
Crown-gall d' <i>Opuntia vulgaris</i> induit par « Anthémis » . . .	—	72,1 %

Dans les tératomes de tabac induits par T_{37} , il faut souligner la présence, à côté de la nopaline, métabolite caractéristique de ces tissus, de traces d'octopine radioactive; c'est la première fois que la nopaline et l'octopine ont pu être mises en évidence dans un même tissu.

Dans les tissus tumoraux de tabac et de scorsonère, des traces d'acide octopinique radioactif accompagnent l'octopine; on peut émettre deux hypothèses pour expliquer ce résultat : ou bien l'acide octopinique provient directement de l'hydrolyse de l'octopine ou bien c'est l'ornithine, produit de dégradation de l'arginine, qui en est le précurseur.

Parmi les autres acides aminés marqués au ^{14}C , nous retrouvons comme dans les tissus sains, les produits de dégradation classiques de l'arginine : l'acide γ -guanidobutyrique et l'acide γ -aminobutyrique.

La présence d'acide glutamique, de glutamine, de proline marqués au ^{14}C permet de supposer l'existence d'une certaine activité arginasique dans ces tissus.

Ces expériences montrent donc que dans les tissus de Crown-gall l'arginine est le précurseur de la nopaline et de l'octopine; la biosynthèse de ces guanidines semble particulièrement active puisqu'elles sont les métabolites les plus radioactifs de ces tissus.

2. — RÔLE DU PYRUVATE DANS LA BIOSYNTHÈSE DES GUANIDINES

Jusqu'à présent, l'étude de la biogenèse des guanidines monosubstituées montrait que ces composés dérivent de l'arginine, soit par transfert de son groupement amidine sur une chaîne carbonée — c'est le cas, par exemple, de la galégine, de l'audouine et de la canavanine —, soit par dégradation du reste de la molécule : ainsi l'acide γ -guanidobutyrique, l'agmatine, l'acide arginique...

Dans le cas de l'octopine et de la nopaline, un nouveau type de biosynthèse apparaît; l'arginine, nous l'avons montré, est le précurseur de ces substances; il s'agit alors de la condensation, sur l'azote α -aminé, de la molécule d'arginine toute entière avec un radical carboné : propionique dans le cas de l'octopine, glutarique dans le cas de la nopaline.

En outre, dans les tissus de Crown-gall à octopine, où ce type de liaison semble répandu, il apparaît que non seulement l'arginine participe à de telles réactions, mais aussi la lysine pour donner la lysopine et l'ornithine pour donner l'acide octopinique. Ceci conduit à penser qu'il y a, dans les tissus de Crown-gall, un nouveau type d'enzymes capables de réaliser de telles condensations.

Le métabolisme de l'octopine a été parfaitement étudié par THOAI et ROBIN chez les invertébrés marins (1959, 1961); leurs travaux ont montré que l'octopine a pour précurseurs l'arginine provenant de l'hydrolyse du phosphagène produit au cours de la contraction musculaire et l'acide

pyruvique; d'autre part, on ne rencontre l'octopine que dans les muscles d'invertébrés marins, où l'activité de la lacticodéshydrogénase est très faible; le pyruvate non réduit en lactate se combine alors avec l'arginine pour former l'octopine. Ces deux produits se condensent en présence d'une enzyme très spécifique : l'octopine-synthétase. Nous avons fait l'hypothèse qu'il en était de même dans les tissus de Crown-gall; dans ces tumeurs, l'acide pyruvique pourrait suivre une voie métabolique nouvelle : une partie de l'acide pyruvique serait détournée de sa voie normale et serait utilisée pour la synthèse de l'octopine, de l'acide octopinique et de la lysopine. Ceci nous a conduit à une étude comparée de l'incorporation d'acide pyruvique radioactif dans les tissus sains et les tissus de Crown-gall. Nous avons choisi les cultures de tissus de *Scorzonera hispanica*.

**A. — Etude de l'incorporation d'acide pyruvique 2-¹⁴C
dans les tissus de Crown-Gall de scorsonère.**

Chez les invertébrés marins, l'octopine a pour précurseurs l'arginine et l'acide pyruvique avec la participation de l'octopine-synthétase, qui est une déshydrogénase ayant pour cofacteur NAD. La réaction peut s'écrire globalement :



Pour assurer une synthèse active d'octopine, les tissus sont cultivés, au cours de ces expériences, sur un milieu enrichi en arginine, en présence de pyruvate de sodium et de NADH. Les cultures de tissus de Crown-gall de scorsonère sont issues de la souche isolée par GAUTHERET; elles sont âgées de 4 semaines. Le pyruvate utilisé est du pyruvate de sodium 2-¹⁴C provenant du « Radio Chemical Center » d'Amersham (Angleterre); NADH est un produit Sigma.

Les tissus, coupés en fragments de 50 à 100 mg, sont placés dans quatre fioles de FOURNEAU contenant chacune 10 ml de milieu de HELLER; ce milieu est additionné de 300 mg/l de chlorhydrate d'arginine; on y ajoute aseptiquement le pyruvate 2-¹⁴C (30 μ C) et NADH (5 mg). Les temps d'expérience sont de 6 et 12 heures. Deux fioles sont utilisées pour chaque essai; chaque fiole contient 8 g de tissus. Après fixation des tissus, les acides aminés extraits ont été analysés et leur radioactivité mesurée.

a) **Analyse des acides aminés.** — Nous avons obtenu des résultats identiques après 6 et 12 heures d'incubation. Les acides aminés les plus abondants sont l'acide glutamique, la lysopine, l'alanine, l'arginine et les amines. Nous retrouvons les métabolites caractéristiques des tissus de Crown-gall : la lysopine et l'octopine. L'acide octopinique a été mis en évidence par chromatographie sur papier.

Au cours de la séparation chromatographique, une partie de l'éluat, au sortir de la colonne de l'analyseur Technicon, est dirigée sur un collecteur de fractions; la radioactivité de chaque fraction est mesurée au

compteur à scintillation automatique. Nous avons ainsi obtenu 9 pics de radioactivité, que nous avons pu déterminer en nous aidant du chromatogramme de l'analyseur Technicon. Ce résultat a ensuite été confirmé par l'autoradiographie des chromatogrammes sur papier. La figure 13 montre la courbe de radioactivité obtenue.

Les pics d'acide aspartique, glutamine, acide glutamique, alanine, acide γ -aminobutyrique et octopine ont été identifiés sans ambiguïté; la nature du premier pic est inconnue pour le moment; on peut calculer son

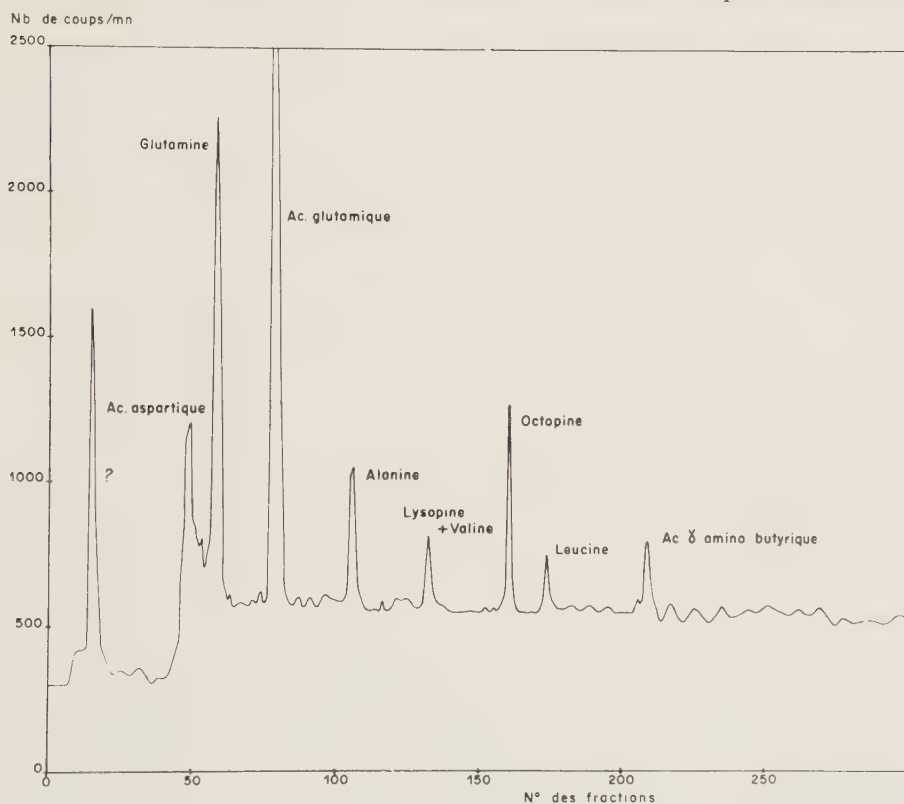


FIG. 13. — Acides aminés radioactifs des tissus de Crown-gall de *Scorzonera hispanica* cultivés 12 heures en présence de pyruvate de sodium $2\text{-}^{14}\text{C}$ + NADH.

point de sortie sur le chromatogramme du Technicon. Il sort 25 mn avant la taurine, qui sert d'étalon interne; il réagit faiblement à la ninhydrine; il doit donc s'agir d'une molécule très acide ou peu ionisée; elle n'apparaît pas sur les autoradiogrammes. Le pic radioactif de la lysopine recouvre à la fois les pics de lysopine et de valine car les autoradiogrammes révèlent que la valine est marquée. Le tableau XIII indique la répartition de la radioactivité dans les acides aminés des tissus de Crown-gall cultivés 12 heures en présence de pyruvate de sodium $2\text{-}^{14}\text{C}$ et de NADH.

TABLEAU XIII. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS
EN % DE LA RADIOACTIVITÉ TOTALE INCORPORÉE DANS LA FRACTION ACIDES AMINÉS

Premier pic inconnu	10,9 %
Acide aspartique	15,4 %
Glutamine	19,2 %
Acide glutamique	35,9 %
Alanine	5,7 %
Lysopine + valine	2,9 %
Octopine	6,3 %
Leucine	1,2 %
Acide γ -aminobutyrique	2 %

La même expérience, dans des conditions identiques, a été répétée avec les cultures de tissus de Crown-gall de scorsonère mais NADH a été supprimé. Le tableau XIV indique la répartition de la radioactivité dans les acides aminés des tissus cultivés 12 heures en présence de pyruvate de sodium $2\text{-}^{14}\text{C}$.

TABLEAU XIV. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LA FRACTION ACIDES AMINÉS

Acide aspartique + acide glutamique	68 %
Glutamine	3,2 %
Asparagine	1,2 %
Alanine	11,2 %
Lysopine	6,1 %
Acide γ -aminobutyrique	3,6 %
Valine	0,8 %
Arginine	3,2 %
Acide octopinique	0,6 %
Inconnu 1	0,5 %
Inconnu 2	0,9 %

La lysopine est marquée, l'acide octopinique aussi mais très faiblement. Par contre, l'octopine n'est pas radioactive : NADH est donc un cofacteur indispensable à la réaction de condensation de l'arginine et du pyruvate. Une enzyme différente doit intervenir dans la biosynthèse de l'acide octopinique et de la lysopine.

b) **Analyse des acides organiques.** — Par chromatographie sur papier à deux dimensions, les acides organiques suivants ont été mis en évidence :

- acide oxalique,
- acide citrique,
- acide malique,
- acide malonique,
- acide succinique.

L'autoradiographie a permis de déterminer les acides radioactifs : les acides citrique et malique sont nettement marqués au ^{14}C ; les acides α -céto-glutarique, succinique et lactique sont faiblement radioactifs.

B. — Etude de l'incorporation d'acide pyruvique 2^{14}C dans les cultures de tissus sains de scorsonère.

Les conditions de l'expérience sont identiques à celles de l'expérience précédente. Les cultures de tissus normaux de scorsonère issus de la souche de GAUTHERET sont âgées de 6 semaines. Les tissus — 8 g de poids frais — sont répartis dans deux fioles : le pyruvate de sodium 2^{14}C correspon-

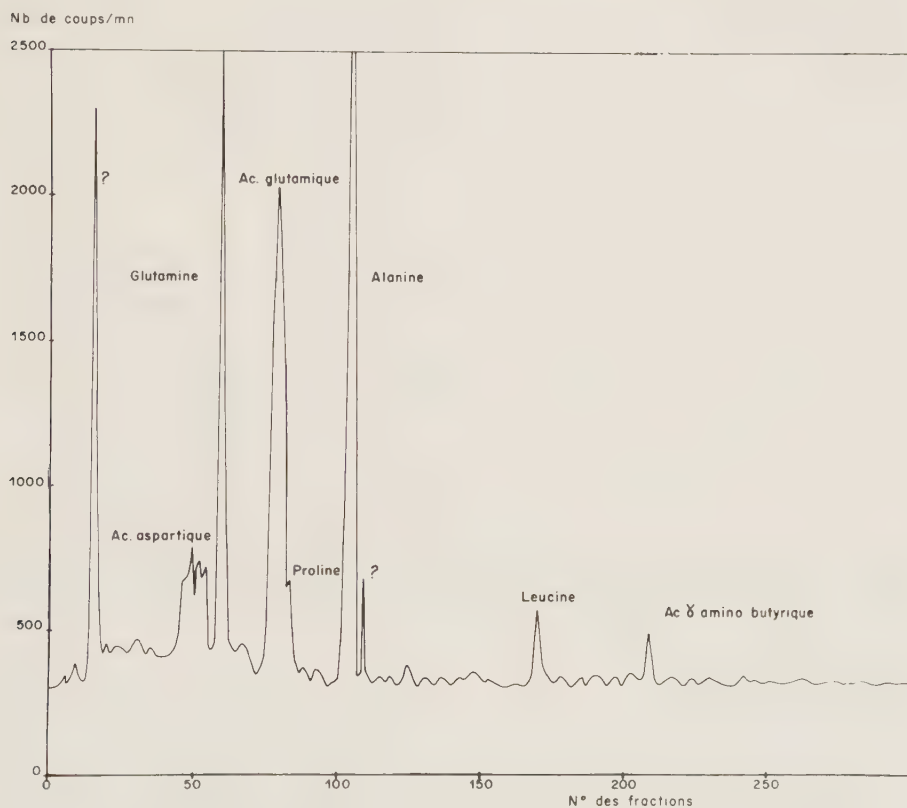


FIG. 14. — Acides aminés radioactifs des tissus sains de *Scorzonera hispanica* cultivés 12 heures en présence de pyruvate de sodium 2^{14}C + NADH.

nant à une radioactivité de $20\ \mu\text{C}$ est ajouté au milieu liquide de HELLER ainsi que NADH (1,6 mg). Le milieu de culture est enrichi en arginine (300 mg/l). La durée de l'expérience est de 12 heures.

a) **Analyse des acides aminés.** — L'analyse des acides aminés a été faite comme précédemment à l'aide de l'analyseur Technicon; la chromatographie sur papier a permis de vérifier les résultats. Les acides aminés les plus abondants sont : les amines, l'acide glutamique, l'alanine, la proline et l'acide γ -aminobutyrique.

Huit composés radioactifs ont pu être déterminés : leur identité a été vérifiée par autoradiographie. La figure 14 montre la courbe de radioactivité obtenue.

Les pics de glutamine, acide glutamique, alanine, leucine, acide γ -aminobutyrique et proline ont été facilement identifiés. La nature du premier pic est indéterminée pour le moment; il correspond au pic inconnu déjà trouvé dans les tissus de Crown-gall. Le second pic, très étalé et irrégulier, correspond au mélange acide aspartique - thréonine - sérine; cette mauvaise séparation est due à une surcharge de la colonne analytique, nécessaire pour la mise en évidence des éléments radioactifs. Juste après l'alanine, on note un second pic de nature inconnue. Le tableau XV indique la répartition de la radioactivité dans les acides aminés des tissus sains cultivés 12 heures en présence de pyruvate de sodium $2\text{-}^{14}\text{C}$ et de NADH.

TABLEAU XV. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LA FRACTION ACIDES AMINÉS

Premier pic inconnu	12,6 %
Acide aspartique + sérine + thréonine	10,1 %
Glutamine	18,2 %
Acide glutamique + proline	26,6 %
Alanine	28,1 %
Pic inconnu	0,8 %
Leucine	1,9 %
Acide γ -aminobutyrique	1,2 %

b) Analyse des acides organiques. — L'analyse des acides organiques par chromatographie sur papier à deux dimensions a permis de mettre en évidence les acides suivants :

- acide oxalique,
- acide citrique,
- acide malique,
- acide malonique.

L'autoradiographie a permis de détecter une incorporation de radioactivité dans les acides citrique, malique, malonique et succinique.

C. — Comparaison du métabolisme de l'acide pyruvique dans les deux types de tissus.

Les chromatogrammes d'acides carboxyliques ont montré, comme nous venons de le voir, que la radioactivité du pyruvate est incorporée dans les composés classiques auxquels on pouvait s'attendre. Il en est de même pour les acides aminés normaux, à l'exception de la molécule éluee en tête du chromatogramme et que nous n'avons pu identifier.

Nous retrouvons, par contre, un marquage important dans l'octopine;

l'acide octopinique et la lysopine sont également marqués, indiquant que le reste propionyl de la molécule provient du pyruvate; 1,5 % de la radioactivité totale se retrouve dans la lysopine, 6 % dans l'octopine en présence de NADH, par contre, cette substance n'est pas marquée en l'absence de NADH, ceci laisse supposer la participation d'une déshydrogénase analogue à l'octopine-synthétase étudiée chez les invertébrés par THOAI et ROBIN (1961). Rappelons que cette réaction se fait en deux étapes : d'abord une condensation chimique entre l'arginine et l'acide pyruvique réagissant sous sa forme cétonique, ce qui donne une base de SCHIFF, puis une réduction enzymatique du produit formé. Nous sommes en droit de penser que, dans les tissus de Crown-gall, les mécanismes de la biosynthèse de l'octopine sont identiques à ceux des invertébrés marins.

Remarquons qu'en présence de NADH, l'acide octopinique n'est pas marqué alors qu'il le devient en l'absence de ce cofacteur. Nous avions tout d'abord pensé que cet acide aminé pouvait provenir de l'hydrolyse de l'octopine; cette expérience montre qu'il n'en est rien; il doit s'agir d'une synthèse directe, analogue à celle qui produit la lysopine, mettant vraisemblablement en jeu une enzyme spéciale.

Le pourcentage de radioactivité incorporée dans l'alanine appelle également quelques remarques. Dans les tissus normaux, nous retrouvons 28 % de la radioactivité du pyruvate dans cette substance; dans les tissus tumoraux, 5 % seulement. La synthèse de l'alanine est donc beaucoup plus faible dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux. Ce résultat semble indiquer que, dans les tissus de Crown-gall, une partie du pyruvate normalement utilisé à cette synthèse est détournée au profit de la synthèse d'octopine et de lysopine. Il faut en outre admettre que dans les tissus tumoraux, il y a une diminution de l'activité de la transaminase qui effectue la transformation du pyruvate en alanine. Nous nous trouvons devant un cas comparable à celui étudié par ROBIN et THOAI (1961); en effet, dans les muscles d'invertébrés marins, il existe également un métabolisme spécial de l'acide pyruvique. Dans le métabolisme classique du muscle, l'acide pyruvique formé au cours de la glycolyse est réduit en acide lactique par la lacticodéshydrogénase; chez les « animaux à octopine », au contraire, il se condense avec l'arginine; l'acide lactique n'est plus qu'une voie secondaire de son métabolisme; ces animaux possèdent effectivement une lacticodéshydrogénase très peu active par rapport à celle des animaux sans octopine.

D. — Participation du pyruvate à la biosynthèse de la nopaline.

Par analogie avec l'octopine, il est logique de penser que la nopaline est le résultat de la condensation de l'arginine et de l'acide α -cétoglutarique. Effectivement, nous avons pu montrer que l'arginine est le précurseur de cette molécule; l'absence, d'autre part, de lysopine et d'acide octopinique dans

les « tumeurs à nopaline » conduit à penser que l'acide pyruvique n'intervient pas directement dans le métabolisme de cette guanidine.

Néanmoins, pour essayer d'établir un lien avec le métabolisme des tissus à octopine, nous avons réalisé une expérience d'incorporation de pyruvate radioactif dans les tissus de Crown-gall d'*Opuntia vulgaris*.

Des cultures de tissus de Crown-gall d'*Opuntia* ont donc été cultivées sur un milieu liquide contenant du pyruvate de sodium $2\text{-}^{14}\text{C}$ et NADH dans des conditions identiques à celles des tissus de scorsonère.

Les cultures sont âgées de 6 semaines; elles proviennent de la souche isolée par G. MOREL. Elles sont placées dans deux fioles de FOURNEAU contenant chacune 10 ml du milieu liquide de HELLER enrichi en arginine (300 mg/l); on y ajoute aseptiquement du pyruvate de sodium entraîneur (15 mg), du pyruvate de sodium $2\text{-}^{14}\text{C}$ et NADH (1,5 mg).

Les acides aminés ont été analysés par chromatographie sur papier à deux dimensions; les acides aminés radioactifs ont été déterminés par autoradiographie.

Le tableau XVI indique la répartition de la radioactivité dans les acides aminés des tissus de Crown-gall cultivés 12 heures en présence de pyruvate de sodium et de NADH.

TABLEAU XVI. — LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN %
DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LA FRACTION ACIDES AMINÉS

Acide aspartique	2 %
Acide glutamique	14,3 %
Glutamine	38,1 %
Alanine	12,1 %
Acide γ -aminobutyrique	11 %
Valine	4,3 %
Proline	5,7 %
Acide γ -guanidobutyrique	6,51 %
Nopaline	5 %

Comme dans les tissus de Crown-gall de scorsonère, l'acide glutamique, la glutamine, l'alanine et l'acide γ -aminobutyrique sont marqués; il faut noter ici que l'acide aspartique n'est pas radioactif. La différence importante avec les tumeurs de scorsonère est l'absence de lysopine.

La nopaline est marquée; en effet le pyruvate, s'il n'est pas un précurseur direct est, par l'intermédiaire du cycle de KREBS, sur la voie de biosynthèse de l'acide α -cétoglutarique.

CONCLUSION

Nous voudrions maintenant résumer nos principaux résultats et les discuter à la lumière des travaux récents réalisés dans le domaine de l'oncologie animale.

La transformation tumorale entraîne dans les tissus de Crown-gall l'apparition de nouvelles substances azotées : deux guanidines monosubstituées, l'octopine et la nopaline; un acide aminé, l'acide octopinique. LIORET avait déjà isolé un acide aminé particulier à ces mêmes tissus : la lysopine. L'analogie de structure entre ces différents métabolites est frappante : il s'agit toujours d'un acide aminé basique, l'arginine dans le cas de l'octopine et de la nopaline, l'ornithine dans le cas de l'acide octopinique, la lysine dans celui de la lysopine, lié par l'azote en α à un radical propionique ou glutarique.

Les guanidines que nous avons étudiées ont été mises en évidence aussi bien dans les tumeurs primaires que dans les tissus cultivés *in vitro*; nous ne les avons jamais retrouvées dans des tumeurs d'origine différente, telles que tumeurs génétiques, tumeurs virologiques, ni dans des tissus anergiés. Elles n'ont jamais été retrouvées non plus, jusqu'à présent, dans des tissus de plantes saines, ni dans des tissus sains cultivés *in vitro*. Elles semblent donc être spécifiques des tissus de Crown-gall.

Nous avons distingué deux types de tumeurs : les « tumeurs à octopine » et les « tumeurs à nopaline ». Dans les premières, l'octopine est toujours associée à l'acide octopinique et à la lysopine; dans les « tumeurs à nopaline », nous n'avons pas pu déceler jusqu'ici la présence d'autres acides aminés particuliers. Ces deux types de tumeurs ne dépendent pas de la nature de la plante mais sont déterminés par la souche de la bactérie inductrice; ainsi les souches A₆ et B₆ induisent des « tumeurs à octopine », les souches « Anthémis », T₃₇ ou IIBV₇, des « tumeurs à nopaline ». Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence ni octopine ni nopaline dans les bactéries.

L'étude de la biosynthèse de ces substances montre que l'arginine en est le précurseur; comme chez les invertébrés marins, l'octopine des tissus de Crown-gall résulte de la condensation de l'arginine et de l'acide pyruvique. L'octopine-synthétase responsable de cette réaction peut être

considérée comme une déshydrogénase par analogie avec les résultats obtenus par THOAI et ROBIN (1961), chez *Octopus vulgaris*. Il est logique de penser que, selon un mécanisme identique, la nopaline est le produit de condensation de l'arginine et de l'acide α -cétooglutarique, avec intervention d'une autre déshydrogénase. LEJEUNE et JUBIER (1968) ont montré, d'autre part, que la biosynthèse de la lysopine est catalysée par une lysopine déshydrogénase. Il y a donc, dans les tissus transformés, apparition d'une nouvelle catégorie d'enzymes capables de réaliser ces condensations qui semblent être particulières au Crown-gall.

Les guanidines des tissus de Crown-gall traduisent une déviation remarquable du métabolisme de l'arginine; dans les « tumeurs à octopine » que nous avons le mieux étudiées, on assiste en effet à une forte diminution de l'activité arginasique : une partie de l'arginine normalement dégradée en urée et en ornithine est utilisée à la synthèse d'octopine; de même, une partie de l'acide pyruvique utilisée par les tissus sains, selon la voie métabolique classique, à la synthèse d'alanine, paraît être détournée au profit de la synthèse d'octopine.

Ainsi, nous constatons que la transformation tumorale s'accompagne de la modification de certaines activités enzymatiques, diminution de l'activité de l'arginase, et de l'apparition d'activités enzymatiques nouvelles, celles des enzymes responsables de la biosynthèse de l'octopine et de la nopaline.

Quelle est la signification de l'apparition, au cours de la transformation tumorale, des métabolites que nous avons mis en évidence dans les tissus de Crown-gall ?

Le rôle physiologique de ces guanidines est pour l'instant inconnu et on ne peut actuellement considérer leur présence que comme un épiphénomène. LIPPINCOTT et LIPPINCOTT (1970) viennent, cependant, de signaler que la lysopine, l'octopine et la nopaline auraient une influence sur la croissance de tumeurs primaires. De toute manière, l'existence de ces molécules nouvelles et la spécificité de leur induction sont le reflet de modifications plus fondamentales. Elles sont la preuve qu'au cours de la transformation tumorale une « entité » provenant de la bactérie pénètre dans la cellule végétale et y provoque de façon permanente des modifications enzymatiques.

L'existence d'une telle entité a été suggérée depuis longtemps par l'étude des phénomènes d'induction tumorale. DE ROPP en effet, en 1947, avait émis l'hypothèse, à la suite d'expériences de greffes, que l'agent responsable de la transformation tumorale était un facteur transmissible présent dans les tissus de Crown-gall. Plus récemment, AARON-DA CUNHA (1969) a retrouvé ce phénomène d'induction; les cellules tumorales renfermeraient un principe tumorigène libéré par les rayons X et capables d'induire la transformation des cellules normales.

La nature de cette entité n'est pas encore connue. Par analogie avec

le phénomène de la transformation bactérienne, beaucoup d'auteurs ont voulu voir dans l'ADN de la bactérie le « principe inducteur de tumeur » postulé par BRAUN. On a cherché à prouver directement cette hypothèse en essayant d'induire des tumeurs à l'aide de préparations purifiées d'ADN bactérien. KOVOOR (1967) est parvenu ainsi à transformer une souche de tissus sains; il a obtenu des tissus autotrophes à l'auxine, mais il n'a pu démontrer si, dans ce cas, l'ADN de la bactérie est bien incorporé dans le génome de la plante. Des expériences d'hybridation ont montré par ailleurs qu'il existe des séquences communes entre l'ADN de la bactérie et l'ADN de la tumeur, séquences qui n'existent pas dans l'ADN de la plante saine (SCHILPEROORT et al., 1967; MILO et SRIVASTAVA, 1969; QUETIER et al., 1969). Les phages libérés dans certaines conditions par la bactérie ont été aussi considérés comme les agents possibles de la cancérisation (BEARDSLEY, 1955, 1960; ZIMMERER et al., 1966; STONIER et al., 1967; ROUSSAUX et al., 1968), mais, jusqu'à présent, le rôle de ces phages dans la transformation tumorale n'a pu être précisé. Cependant, KURKDJIAN (1968) a retrouvé des phages dans des tumeurs primaires et PARSONS et BEARDSLEY (1968) dans des tissus tumoraux cultivés, *in vitro*, depuis plusieurs années.

Que le « principe inducteur de tumeur » soit une fraction de l'ADN d'*Agrobacterium tumefaciens* ou un virus qui s'intégrerait dans le génome cellulaire, comme c'est le cas pour les tumeurs animales d'origine virale, il se pose alors le problème de l'origine de l'information pour les enzymes qui interviennent dans la biosynthèse des substances nouvelles que nous avons étudiées. Deux hypothèses peuvent être proposées. Dans le premier cas, la cellule saine ne contient pas dans son génome l'information pour l'octopine et la nopaline synthétases et c'est du matériel génétique provenant de la bactérie qui la lui apporte. Le fait que la nature des guanidines trouvées dans les tumeurs dépende de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* et non de la plante elle-même serait en faveur de cette hypothèse; cette spécificité, qui apparaît dans le tissu tumoral, peut d'ailleurs être révélée par l'étude du métabolisme bactérien. Il a en effet été montré (MOREL et al., 1969) que les souches qui provoquent l'apparition d'octopine dans les tissus tumoraux sont capables d'utiliser cette substance comme source d'azote et la dégradent préférentiellement à la nopaline; par contre, les souches qui induisent des « tumeurs à nopaline » dégradent cette guanidine préférentiellement à l'octopine, en dépit de la grande similitude de structure entre ces deux substances. Ainsi, il semble que les deux types de souches bactériennes ont des potentialités différentes qu'elles peuvent transmettre aux cellules saines lors de la transformation tumorale.

Dans le second cas, la cellule saine contient déjà l'information pour l'octopine et la nopaline synthétases mais la synthèse ou le fonctionnement de ces enzymes est réprimé; le matériel génétique apporté par la bactérie devrait alors coder pour une molécule levant cette inhibition; d'une manière générale, il modifierait l'équilibre de la cellule. Il faut rap-

peler que SEITZ et HOCHSTER (1964) prétendent avoir trouvé de la lysopine dans les tiges saines de tomate et de tabac, mais en quantité beaucoup plus faible que dans les tissus de Crown-gall; l'accumulation de cet amino-acide dans les tumeurs serait alors le fait d'une perturbation de la régulation des enzymes responsables de sa biosynthèse. De même, la diminution de l'activité arginasique que nous observons dans les « tumeurs à octopine » est bien le signe que la cellule transformée est soumise à une nouvelle régulation.

Rien ne permet, pour l'instant, de décider laquelle des deux hypothèses que nous venons d'exposer est valable.

Cependant, dans le cas des substances de division, des résultats plus significatifs correspondants à la seconde hypothèse viennent d'être obtenus : WOOD et al. (1969) ont montré que l'information pour la synthèse de la nouvelle cytokinine qu'ils ont isolée des tissus de Crown-gall, est déjà contenue dans le génome des cellules saines; les cellules normales, en effet, sont capables d'élaborer cette même substance mais seulement en présence de kinétine ou de purines substituées.

Dans le cas des cellules cancéreuses animales d'origine virale, le même problème se pose de l'origine de certaines enzymes différentes de celles préexistant dans les cellules normales. Le SV 40 et le virus du polyome provoquent, en effet, quelques heures après l'infection, une augmentation du taux des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ADN de l'hôte; une telle stimulation se produit aussi bien au cours de l'infection lytique que de la transformation (KIT, 1967; KIT et al., 1967). La question se pose ici également de savoir si l'information pour la synthèse de ces enzymes est d'origine virale ou non. Les recherches les plus avancées concernent la thymidine kinase; dans le cas de l'infection lytique, BASILICO et al. (1969) viennent de démontrer que l'information pour la synthèse de cette enzyme n'est pas apportée par le virus. Mais l'ambiguïté des résultats ne permet pas encore de savoir si les différences observées entre les enzymes des cellules normales et des cellules tumorales sont dues à une dérépression d'iso-enzymes ou bien à des modifications de l'activité enzymatique.

On sait qu'une forte activité arginasique apparaît dans les tumeurs provoquées par le virus du « Papillome de Shope ». Après avoir montré que l'arginase de ces tumeurs a des propriétés physiologiques et immunologiques différentes de celles des tissus sains, ROGERS et MOORE (1963) ont émis l'hypothèse que l'information pour la synthèse de cette enzyme provenait du virus. Les recherches plus récentes de ORTH et al. (1967) ont conduit à rejeter cette interprétation et ont suggéré que l'information génétique nécessaire à la synthèse de l'arginase devait se trouver dans le génome du lapin. SATOH et al. (1967) ont d'autre part montré qu'il était plus vraisemblable d'admettre la dérépression d'une iso-enzyme.

Ces exemples de modifications enzymatiques mises en évidence dans les tumeurs animales concernent toujours des enzymes qui existent déjà

dans la cellule saine; dans le cas du Crown-gall, ni l'octopine déshydrogénase ni la nopaline déshydrogénase n'ont pu être mises en évidence jusqu'à présent dans les cellules normales. Ce fait devrait nous permettre une approche moins difficile du délicat problème de l'origine génétique de ces différences enzymatiques. Nous pensons qu'une étude approfondie des enzymes qui apparaissent dans les tissus de Crown-gall devrait nous donner la possibilité de choisir entre les deux hypothèses auxquelles nous sommes arrivée : transfert direct d'une information génétique de la bactérie à la cellule végétale ou dérégulation d'enzymes. C'est dans cette voie que nous voulons poursuivre nos recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- AARON-DA CUNHA (M. I.), 1969. — Sur la libération, par les rayons X, d'un principe tumorigène contenu dans les tissus de Crown-gall de Tabac. *C. R. Acad. Sci.*, **268**, p. 318-321.
- AKASI (S.), 1937. — Studien über die Konstitution des Octopins. II. Mitteilung : Synthetische Versuche. *J. Biochem.*, **25**, p. 281-291.
- BALDY (P.) et GUITTON (Y.), 1962. — Sur la présence de l'arginase chez les Ptéridophytes. *C. R. Acad. Sci.*, **254**, p. 911-913.
- BARNES (R. L.), 1962. — Ornithine-2-¹⁴C metabolism in Loblolly pine needles. *Forest Sci.*, **8**, p. 284-287.
- BARNES (R. L.) et NAYLOR (A. W.), 1961. — Utilization of radioactive ornithine by germinating embryos of Longleaf and Slash pine. *Forest Sci.*, **7**, p. 130-135.
- BARRIT (M. M.), 1936. — The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J. Pathol. Bacteriol.*, **42**, p. 441-454.
- BASILICO (C.), MATSUYA (Y.) et GREEN (H.), 1969. — Origin of the thymidine kinase induced by polyoma virus in productively infected cells. *J. Virol.*, **3**, p. 140-145.
- BEARDSLEY (R. E.), 1955. — Phage production by Crown-gall bacteria and the formation of plant tumors. *Amer. Naturalist*, **89**, p. 175-176. — 1960. Lysogenicity in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, **80**, p. 180-187.
- BIEMANN (K.), LIORET (C.), ASSELINEAU (J.), LEDERER (E.) et POLONSKY (J.), 1960. — Sur la structure chimique de la lysopine, nouvel acide aminé isolé de tissu de Crown-gall. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, p. 979-991.
- BOYLE (A.) et PRICE (R. M.), 1963. — Vancomycin prevents Crown-gall. *Phytopathology*, **53**, p. 1272-1276.
- BRANDNER (G.) et VIRTANEN (A. I.), 1964. — α -keto- δ -guanidinovaleriansäure und γ -hydroxy- α -ketoglutarsäure in grünen teilen und samen von Phlox pflanzen. *Acta Chem. Scand.*, **18**, p. 574-575.
- BRAUN (A. C.), 1947. — Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in Crown-gall. *Amer. J. Bot.*, **34**, p. 234-240. — 1951. Recovery of Crown-gall tumor cells. *Cancer Res.*, **11**, p. 839-844. — 1969. The cancer problem. *Columbia University Press*, New York et Londres, p. 63.
- BRUNEL (A.) et BRUNEL-CAPELLE (G.), 1965. — Activité arginasique chez *Arum italicum* Mill., organes reproducteurs. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, p. 4213-4215.
- BRUNEL-CAPELLE (G.) et BAILLY-FENECH (G.), 1967. — L'arginase de *Vicia faba* L., répartition et biosynthèse. *C. R. Acad. Sci.*, **265**, p. 792-795.
- BUSCH (H.), 1963. — Biochemical frontiers in medicine. *Busch H.*, édit., Little, Brown and Co., Boston, p. 210-226.
- CARNEGIE (P. R.), 1963. — Isolation of a homologue of glutathione and other acidic peptides from seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biochem. J.*, **89**, p. 459-471.
- CASSINGENA (R.) et TOURNIER (P.), 1968. — Mise en évidence d'un « répresseur » spécifique dans des cellules d'espèces différentes transformées par le virus SV 40. *C. R. Acad. Sci.*, **267**, p. 2251-2254.
- CHAN (W. N.) et STABA (E. J.), 1965. — Alkaloids production by *Datura callus* and suspension tissue cultures. *Lloydia*, **28**, p. 55-62.

- CHEFTEL (R. J.), MUNIER (R.) et MACHEBŒUF (M.), 1952. — Microchromatographie sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. II. Utilisation d'une phase solvante alcaline puis d'une phase solvante acide pour la microchromatographie à deux dimensions. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, p. 380-387.
- CONSIGLI (R. A.) et GINSBERG (H. S.), 1964. — Activity of aspartate transcarbamylase in uninfected and type 5 adenovirus-infected HeLa cells. *J. Bacteriol.*, **87**, p. 1034-1043.
- DARLING (S.) et LARSEN (P. O.), 1961. — Saccharopine, a new amino-acid in baker's and brewer's yeast. I. Isolation and properties. *Acta Chem. Scand.*, **15**, p. 743-749.
- DE ROPP (R. S.), 1947. — The growth promoting and tumefacient factors of bacteria free Crown-gall tumor tissue. *Amer. J. Bot.*, **34**, p. 248-261.
- DULBECCO (R.), 1969. — Viruses in carcinogenesis. *Ann. Int. Med.*, **70**, p. 1019-1030.
- DURANTON (H.), 1958. — Evolution de l'arginine dans le tubercule de Topinambour au cours du cycle végétatif. *C. R. Acad. Sci.*, **246**, p. 2655-2657. — 1959. Etude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus du Topinambour cultivés *in vitro*. Thèse, Doctorat d'Etat, Paris, 77 p.
- DURZAN (D. J.) et RICHARDSON (R. G.), 1966. — The occurrence and role of α -keto- δ -guanidinovaleric acid in White spruce (*Picea glauca* Moench). *Canad. J. Biochem.*, **44**, p. 141-143.
- FASOLD (H.), TURBA (F.) et WIRSCHING (W.), 1961. — Darstellung und chromatographische Trennung von guanido-amino-säuren. *Biochem. Z.*, **335**, p. 86-91.
- FEARON (W. R.), 1946. — The amidine pentacyanoferrate reaction : a test for guanidines, urea and thiourea. *Analyst*, **71**, p. 562-566.
- FEARON (W. R.) et BELL (E. A.), 1955. — Canavanine : detection and occurrence in *Colutea arborescens*. *Biochem. J.*, **59**, p. 221-224.
- FORRESTER (J. A.), AMBROSE (E. J.) et MACPHERSON (J. A.), 1962. — Electrophoretic investigations of a clone of hamster fibroblasts and polyoma-transformed cells from the same population. *Nature*, **196**, p. 1068-1070.
- FUKAMI (T.) et MACKINNEY (G.), 1967. — Culture of tomato callus tissue. *Nature*, **213**, p. 944-945.
- FULLER (W. C.) et GIBSON (H. R.), 1952. — The arginase alkaloid relationship in *Datura tatula* L. *J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed.*, **41**, p. 263-266.
- GAUTHERET (R. J.), 1939. — Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Acad. Sci.*, **208**, p. 118-120.
- GIRARDI (A. J.), JENSEN (F. C.) et KOPROWSKI (H.), 1965. — SV 40 induced transformation of human diploid cells : crisis and recovery. *J. Cell Comp. Physiol.*, **65**, p. 69-84.
- GOLDMANN (A.) et MOREL (G.), 1967. — Culture et particularités biochimiques de différents tissus d'*Opuntia vulgaris*. *Coll. Nat. C.N.R.S. sur les cultures de tissus de plantes*, Strasbourg, p. 251-257.
- GOLDMANN (A.), TEMPÉ (J.) et MOREL (G.), 1968. — Quelques particularités de diverses souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. *C. R. Soc. Biol.*, **162**, p. 630-631.
- GOLDMANN (A.), THOMAS (D. W.) et MOREL (G.), 1969. — Sur la structure de la nopaline, métabolite anormal de certaines tumeurs de Crown-gall. *C. R. Acad. Sci.*, **268**, p. 852-854.
- GUITTON (Y.), 1957. — Sur le métabolisme azoté des Gymnospermes : présence de l'arginase dans les graines. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, p. 1157-1160.
- HARDEGGER (E.), LIETCHI (P.), JACKMAN (L. M.), BOLLER (A.) et PLATTNER (A.), 1963. — Die constitution des Lycomarasmines. *Helv. Chim. Acta*, **46**, p. 60-74.
- HENDERSON (J. H. M.) et BONNER (J.), 1952. — Auxin metabolism in normal and Crown-gall tissue of sunflower. *Amer. J. Bot.*, **39**, p. 444-451.
- HIGASHINO (K.), TSUKADA (K.) et LIEBERMANN (I.), 1965. — Saccharopine, a product of lysine breakdown by Mammalian liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **20**, p. 285-290.
- HUTZLER (J.) et DANCIS (J.), 1968. — Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochem. Biophys. Acta*, **158**, p. 62-69.

- IRREVERRE (F.), EVANS (R. L.), HAYDEN (A. R.) et SILBER (R.), 1957. — Occurrence of γ -guanidinobutyric acid. *Nature*, **180**, p. 704-705.
- IZUMIYA (N.), WADE (R.), WINITZ (M.), OTEY (M. C.), BIRNBAUM (S. M.), KOEGEL (R. J.) et GREENSTEIN (J. P.), 1957. — Studies on diastereoisomeric α -amino-acids and corresponding α -hydroxy-acids. VIII. Configuration of the isomeric octopines. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, p. 652-658.
- JINDRA (A.) et STABA (E. J.), 1968. — Datura tissue cultures : arginase, transaminase and esterase activities. *Phytochemistry*, **7**, p. 79-82.
- KASTING (R.) et DELWICHE (C. C.), 1958. — Ornithine, citrulline, arginine metabolism in watermelon seedlings. *Plant. Physiol.*, **33**, p. 350-354.
- KIESEL (A.), 1909. — Autolytische Argininzerersetzung in Pflanzen. *Z. Physiol. Chem.*, **60**, p. 460-461.
- KIT (S.), 1967. — Enzyme induction in cell cultures during productive and abortive infection by papovavirus SV 40. In : The molecular biology of viruses. *Colter J. S. et Paranchych W.*, édit., Acad. Press, New York, p. 495-525.
- KIT (S.), PIEKARSKI (L. J.) et DUBBS (D. R.), 1967. — DNA polymerase induced by Simian Virus 40. *J. Gen. Virol.*, **1**, p. 163-173.
- KOVOOR (A.), 1967. — Sur la transformation de tissus normaux de Scorsonère provoquée *in vitro* par l'acide désoxyribonucléique d'*Agrobacterium tumefaciens*. *C. R. Acad. Sci.*, **265**, p. 1623-1626.
- KREBS (H. A.) et HENSELEIT (K.), 1932. — Untersuchungen über die Harnstoff-bildung in Tierkörper. *Z. Physiol. Chem.*, **210**, p. 33-36.
- KULESHA (Z.) et GAUTHERET (R.), 1948. — Sur l'élaboration de substances de croissance par trois types de tissus de Scorsonère : cultures normales, cultures de Crown-gall et cultures accoutumées à l'hétéro-auxine. *C. R. Acad. Sci.*, **227**, p. 292-294.
- KURKDJIAN (A.), 1968. — Apparition de phages au cours de l'induction des tumeurs de Crown-gall. *J. Micr.*, **7**, p. 1039-1044.
- LANCE (C.), 1967. — Les oxydases terminales des tumeurs végétales. *Coll. Nat. C.N.R.S. sur les cultures de tissus de plantes*. Strasbourg, p. 279-289.
- LARHER (F.) et GOAS (M.), 1967. — Contribution à l'étude du métabolisme azoté de *Limonium vulgare* Hill. Détermination des conditions optimales d'action de l'arginase. *C. R. Acad. Sci.*, **265**, p. 1179-1182.
- LEHMAN (I. R.), BESSMAN (M. J.), SIMMS (E. S.) et KORNBERG (A.), 1958. — Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **233**, p. 163-171.
- LEJEUNE (B.) et JUBIER (M. F.), 1968. — Etude de la synthèse de lysopine à partir de lysine par les tissus de Crown-gall. *C. R. Acad. Sci.*, **266**, p. 1189-1191.
- LEVY (A. L.) et CHUNG (G. D.), 1953. — Two-dimensional chromatography of amino-acids on buffered papers. *Anal. Chem.*, **25**, p. 396-399.
- LIORÉ (C.), 1958. — Recherches sur le métabolisme de deux tissus végétaux cultivés *in vitro*. Thèse, Doctorat d'Etat, Paris, 127 p.
- LIPPINCOTT (J. A.) et LIPPINCOTT (B. B.), 1970. — Lysopine and octopine promote Crown-gall tumor growth *in vivo*. *Science* (sous presse).
- MARETZKI (A.), THOM (M.) et NICKELL (L. G.), 1969. — Products or arginine catabolism in growing cells of sugarcane. *Phytochemistry*, **8**, p. 811-818.
- MEISTER (A.), 1965. — Intermediary metabolism of amino-acids. In : Biochemistry of amino-acids. *Acad. Press*, New York, II, p. 641-642.
- MÉNAGÉ (A.) et MOREL (G.), 1962. — Métabolisme de l'arginine par les tissus de tumeur végétale cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, **255**, p. 2641-2643. — 1964. Sur la présence d'octopine dans les tissus de Crown-gall. *C. R. Acad. Sci.*, **259**, p. 4795-4796. — 1965. Sur la présence d'un acide aminé nouveau dans les tissus de Crown-gall. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, p. 2001-2002.
- MÉNAGÉ (A.), TEMPÉ (J.) et MOREL (G.), 1966. — Analyse des acides aminés par chromatographie. II. Détection automatique des guanidines. *Physiol. Vég.*, **4**, p. 317-322.

- MÉNORET (Y.), 1960. — Action de l'acide 2-4-dichlorophénoxyacétique sur le métabolisme azoté des tissus de Carotte cultivés *in vitro*. Thèse, Doctorat d'Etat, Paris, 127 p.
- MIERSCH (J.) et REINBOTHE (H.), 1967. — Metabolism of γ -guanidobutyric acid in fruit bodies of *Panus Tigrinus* (Fr.) Sing. (Tricholomataceæ). *Phytochemistry*, **6**, p. 485-493.
- MILO (G. E.) et SAHAI SRIVASTAVA (B. I.), 1969. — RNA-DNA hybridization studies with the Crown-gall bacteria and the tobacco tumor tissue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **34**, p. 196-199.
- MOORE (S.) et STEIN (W. H.), 1951. — Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **192**, p. 663-681.
- MOREL (G. M.), GOLDMANN (A.), PETIT (A.) et TEMPÉ (J.), 1969. — Evidence for the transmission of a permanent information from *Agrobacterium tumefaciens* to the plant cell during tumoral transformation. XI^e International Botanical Congress, Seattle (U.S.A.), abstract, p. 151.
- MORIZAWA (K.), 1927. — Ueber die Extraktivstoffe von Oktopus oktopodia. *Acta Sch. Med. Univ. Kyoto*, **9**, p. 285-298.
- MOTHES (K.), 1961. — The metabolism of urea and ureides. *Can. J. Bot.*, **39**, p. 1785-1807.
- MOURGUE (M.), BARET (R.) et DOKHAN (R.), 1953. — Sur la présence de dérivés guanidiques dans les graines de Ricin (*Ricinus communis*). *C. R. Soc. Biol.*, **147**, p. 1449-1451.
- NOTKINS (A. L.) et SCHEELE (C.), 1967. — An infectious nucleic acid from the lactic dehydrogenase agent. *Virology*, **20**, p. 640-642.
- ORTH (G.), VIELLE (F.) et CHANGEUX (J. P.), 1967. — On the arginase of the Shope papilloma. *Virology*, **31**, p. 729-732.
- PADIEU (P.) et MALEKNIA (N.), 1965. — Sur un nouveau système de tampons volatils pour la chromatographie des acides aminés sur résine échangeuse de cations. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, p. 493-504.
- PARSONS (L. C.) et BEARDSLEY (R. E.), 1968. — Bacteriophage activity in homogenates of Crown-gall tissue. *J. Virol.*, **2**, p. 651.
- PASSEN (S.) et SCHULTZ (R. B.), 1965. — Use of the Shope Papilloma virus induced arginase as a biochemical marker *in vitro*. *Virology*, **26**, p. 122-176.
- PIATTELLI (M.) et MINALE (L.), 1964. — Pigments of Centrospermae. I. Betacyanins from *Phyllocactus hybridus* hort. and *Opuntia ficus indica* Mill. *Phytochemistry*, **3**, p. 307-311.
- PISANO (J. J.), MITOMA (C.) et UNDENFRIEND (S.), 1957. — Biosynthesis of γ -guanidobutyric acid from γ -aminobutyric acid and arginine. *Nature*, **180**, p. 1125-1126.
- PITOT (H. C.), 1966. — Some biochemical aspects of malignancy. *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 1, p. 335-368.
- PRAGER (M. D.) et BACHYNSKY (N.), 1968. — Asparagine synthetase in normal and malignant tissues : correlation with tumor sensitivity to asparaginase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, p. 645-654.
- QUÉTIER (F.), HUGUET (T.) et GUILLÉ (E.), 1969. — Induction of Crown-gall : partial homology between tumor cell DNA, bacterial DNA and the G + C rich DNA of stressed normal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **34**, p. 128-133.
- REUTER (G.), 1963. — Arginin als Vorstufe von galegin in *Galega officinalis* L. (zur Biochemie und Physiologie von galegin in *Galega officinalis* L. III, Mitt.). *Archiv. Pharm.*, **296**, p. 516-522.
- RIKER (A. J.), BANFIELD (W. M.), WRIGHT (W. H.), KEITT (G. W.) et SAGEN (H.), 1930. — Studies on infectious hairy root of nursey apple trees. *J. Agric. Res.*, **41**, p. 507-540.
- RILEY (V.), LILLY (F.), HUERTO (E.) et BARRELL (D.), 1960. — Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasms. *Science*, **132**, p. 545-547.
- ROBIN (Y.) et THOAI (Ng. V.), 1961. — Métabolisme des dérivés guanidylés. X. Métabolisme de l'octopine : son rôle biologique. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, p. 233-240.
- ROCHE (J.), THOAI (Ng. V.) et GLAHN (P. E.), 1952. — Sur la L. amino-acide oxydase de nombreux invertébrés marins. *Experientia*, **8**, p. 428-429.

- ROGERS (S.) et MOORE (M.), 1963. — Studies on the mechanism of action of the Shope rabbit papilloma virus. I. Concerning the nature of the induction of arginase in the infected cells. *J. Exper. Med.*, **117**, p. 521-542.
- ROSENBERG (H.), ENNOR (A. H.) et MORRISON (J. F.), 1956. — The estimation of arginine. *Biochem. J.*, **63**, p. 153-159.
- ROUSSAUX (J.), KURKDJIAN (A.) et BEARDSLEY (R. E.), 1968. — Bacteriophages d'*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town) Conn. Isolement et caractères. *Ann. Inst. Pasteur*, **114**, p. 237-247.
- SAKAGUCHI (S.), 1925. — A new color reaction for protein and arginine. *J. Biochem.*, **5**, p. 25-31.
- SATOH (P. S.), YOSHIDA (T. D.) et ITO (Y.), 1967. — Studies on the arginase activity of Shope papilloma : possible presence of isozymes. *Virology*, **33**, p. 354-356.
- SAUNDERS (P. P.) et BROQUIST (H. P.), 1966. — Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **241**, p. 3435-3440.
- SCHILPEROORT (R. A.), VELDSTRA (H.), WARNAAR (S. O.), MULDER (G.) et COHEN (J. A.), 1967. — Formation of complexes between DNA isolated from tobacco Crown-gall tumours and RNA complementary to *Agrobacterium tumefaciens* DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **145**, p. 523-525.
- SCOTT (K. J.), CRAIGIE (J. S.) et SMILLIE (R. M.), 1964. — Pathways of respiration in plant tumors. *Plant Physiol.*, **39**, p. 323-327.
- SEITZ (E. W.) et HOCHSTER (R. M.), 1964. — Lysopine in normal and in Crown-gall tumor tissue of tomato and tobacco. *Can. J. Bot.*, **42**, p. 999-1004.
- SHEIN (H. M.), ENDERS (J. F.), PALMER (L.) et GROGAN (E.), 1964. — Further studies on SV 40-induced transformation in human renal cells cultures. I. Eventual failure of subcultivation despite a continuing high rate of cell division. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **115**, p. 618-621.
- SMITH (E. F.) et TOWNSEND (C. O.), 1907. — A plant tumor of bacterial origin. *Science*, **25**, p. 671-673.
- SMITH (E. F.), 1912. — On some resemblances of Crown-gall to human cancer. *Science*, **35**, p. 161-172. — 1916. Further evidence that Crown-gall of plants is cancer. *Science*, **43**, p. 871-889. — 1925 *a*. Le cancer des plantes ou Crown-gall. *Rev. Bot. Appl. Agric. Col.*, **5**, p. 97-105. — 1925 *b*. Cancer in plants and in man. *Science*, **61**, p. 419-420. — 1926. Recent cancer research. *Amer. Naturalist*, **60**, p. 240-256.
- SMITH (I.) et HORSEWELL (H. G.), 1960. — General procedures for the isolation and chromatography of guanidines. In : *Chromatographic and electrophoretic techniques*, vol. I, Chromatography., I. Smith, édit., Interscience Publishers, p. 228-229.
- SMITH (T. A.), 1963. — L-arginine carboxy-lyase of higher plants and its relation to potassium nutrition. *Phytochemistry*, **2**, p. 241-252.
- STOCK (C. H.), PERKINS (M. E.) et HELLERMANN (L.), 1938. — Activation of enzymes. IV. The Jack bean arginolytic enzyme. *J. Biol. Chem.*, **125**, p. 753-769.
- STONIER (T.), 1960. — *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *J. Bacteriol.*, **79**, p. 889-898.
- STONIER (T.), MC SHARRY (J.), et SPEITEL (T.), 1967. — *Agrobacterium tumefaciens* Conn. IV. Bacteriophage PB₂ and its inhibitory effect on tumor induction. *J. Virol.*, **1**, p. 268-273.
- THOAI (NG. V.) et ROBIN (Y.), 1959. — Métabolisme des dérivés guanidylés. VIII. Biosynthèse de l'octopine et répartition de l'enzyme l'opérant chez les invertébrés. *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, p. 446-453. — 1961. Métabolisme des dérivés guanidylés. IX. Biosynthèse de l'octopine : étude du mécanisme de la réaction et de quelques propriétés de l'octopine synthétase. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, p. 221-233.
- VOGES (O.) et PROSKAUER (B.), 1898. — Beitrag zur Ernährungs-physiologie und zur Differential-diagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicämie. *Hyg. Infektionskrankh.*, **28**, p. 20-32.

- WARBURG (O.), 1926. — Ueber den Stoffwechsel der tumoren. *Springer*, édit., Berlin, trad. Aubel et Genevois (1928), Lib. F. Alcan, Paris. — 1966. Ueber die Ursache des Krebses in molecular Biologie des malignen Wachstums. *Springer*, édit., p. 1-10.
- WOOD (H. N.) et BRAUN (A. C.), 1965. — Studies on the net uptake of solutes by normal and Crown-gall tumor cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**, p. 1532-1538.
- WOOD (H. N.), BRAUN (A. C.), BRANDES (H.) et KENDE (H.), 1969. — Studies on the distribution and properties of a new class of cell division-promoting substances from higher plant species. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **62**, p. 349-356.
- WRIGHT (W. H.), HENDRICKSON (A. A.) et RIKER (A. J.), 1930. — Studies on the progeny of single-cell isolations from the hairy-root and Crown-gall organisms. *J. Agric. Res.*, **41**, p. 541-547.
- YOSHIDA (D.) et MITAKE (T.), 1966. — Agmatine and N-carbamylputrescine as intermediates in the formation of nicotine by Tobacco plants. *Plant Cell Physiol.*, **7**, p. 301-305.
- ZIMMERER (R. P.), HAMILTON (R. H.) et POOTJES (C.), 1966. — Isolation and morphology of temperate *Agrobacterium tumefaciens* bacteriophage. *J. Bacteriol.*, **92**, p. 746-750.
-

MASSON et C^{ie}, Editeurs.
120, B^d S^t-Germain, Paris (VI^e).
Dépôt légal : 1^{er} trimestre 1971.
N^o 4480.

Imprimé
en France.

SOULISSE et CASSEGRAIN,
Imprimeurs, Niort.
Dépôt légal : 1^{er} trimestre 1971.
N^o 1022.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 12 février 1970.

**Le Doyen
de la Faculté des Sciences de Paris,**

MARC ZAMANSKY.

VU

ET PERMIS D'IMPRIMER :

**Le Recteur
de l'Académie de Paris.**

ROBERT MALLET.

